



**ESTUDIO SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS
CLÍNICAS Y LA INFLUENCIA GENÉTICA EN LA
SUSCEPTIBILIDAD A LA ENFERMEDAD
MENINGOCÓCICA EN LA EDAD PEDIÁTRICA**

**TESIS DOCTORAL: SONIA MARCOS ALONSO
DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA. FACULTAD DE MEDICINA.**

Don Federico Martínón Torres, Doctor en Medicina y Cirugía, Acreditado como Profesor Titular por la ANECA, y Médico adjunto del Servicio de Críticos, Intermedios y Urgencias Pediátricas del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, Don José María Martínón Sánchez, Profesor de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela y Don Antonio Salas Ellacuriaga, Profesor de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela.

CERTIFICAMOS:

Que la presente Tesis Doctoral aborda un aspecto importante en el tratamiento del niño enfermo, utiliza un enfoque original y novedoso, ha sido realizada con el rigor metodológico pertinente y exigible; y, las conclusiones que de él se derivan suponen un avance significativo en el conocimiento de la fisiopatología, el manejo terapéutico y en el pronóstico de los niños afectados de enfermedad meningocócica.

Que la licenciada, Dña. Sonia Marcos Alonso, ha realizado la presente Tesis Doctoral bajo nuestra dirección, y consideramos que su trabajo está en condiciones de ser presentado a juicio del Tribunal para obtener el grado de Doctora en Medicina.

En, Santiago de Compostela, a 11 de julio de 2011

Fdo.

Directores:

D. Federico Martínón Torres

D. Antonio Salas Ellacuriaga

D. José María Martínón Sánchez

Doctorando:

Dña. Sonia Marcos Alonso

DEDICATORIA

A todos los niños y niñas que han sufrido las consecuencias de la enfermedad meningocócica así como a sus familias que dando su consentimiento han hecho posible llevar a cabo este proyecto de investigación.

S. Marcos Alonso

AGRADECIMIENTOS

Llegado este momento se impone la necesidad, más que la simple obligación cortés de expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que de algún modo me han inspirado, animado y apoyado en la realización de la tesis doctoral.

A mi madre y a mi hermana a quienes debo en gran parte todo lo que soy y lo que he logrado en la vida. A mi padre por su apoyo. A mi madrina por estar siempre cerca de mí, apoyándome en cada etapa mi vida.

A mis directores de tesis, Dr. Federico Martinón Torres, Dr. Antonio Salas Ellacuriaga y Dr. José María Martinón Sánchez, por toda la paciencia, por confiar y creer en mí. Por ayudarme a encontrar el sentido de todo el esfuerzo desempeñado en la realización de este proyecto. Han sido modelo de trabajo. Me siento afortunada de poder celebrar y compartir con ellos la culminación de este estudio.

Agradecer particularmente a los Dres. José María Martinón Sánchez y Antonio Rodríguez Núñez por haber constituido, además, el marco de mi desarrollo profesional en el campo de los cuidados intensivos pediátricos, puerta que me brindó la oportunidad de realizar esta tesis. Vuestra experiencia profesional fue también fuente de inspiración de este trabajo.

Gracias al Dr. Ángel Carracedo Álvarez, quien escuchó por primera vez la idea del proyecto y nos impulsó, defendió y apoyó para que todo esto fuera posible. Ha sido un honor formar parte de su equipo de investigación.

También, agradezco a la Dra. Ana Vega Gliemmo su comprensión y apoyo a lo largo de estos años; por su paciencia, disponibilidad y cariño. Sin su ayuda este proyecto no podría haber salido adelante.

Quiero hacer extensivo mi agradecimiento al personal administrativo de la Unidad de Críticos, Urgencias Pediátricas del Hospital Clínico Universitario de Santiago y de la Unidad de Medicina Xenómica del Hospital. En especial a Belén Mosquera por su implicación directa y constancia en el trabajo. Asimismo al personal técnico de laboratorio de Medicina Xenómica por su labor desinteresada y, en concreto, a Laura Fachal Vilar por ayudarme a hacer tangible este proyecto mostrando su ilusión y tenacidad.

Gracias al grupo ESIGEM y a todas aquellas personas, que de manera ejemplar y “anónima” han participado en este trabajo. Gran parte del éxito que derive del mismo les pertenece.

Gracias a las familias de todos los niños que dieron su consentimiento para que este estudio pudiera llevarse a cabo a pesar de la difícil situación en la que se encontraban. Sin duda son parte del espíritu de una sociedad que comprende y cree en la necesidad y el sentido de la investigación científica.

En general, quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis doctoral, con sus altos y sus bajos a las que agradezco de corazón el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y cariño.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
ÍNDICE	III
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. REVISIÓN DEL PROBLEMA	9
2.1. ENFERMEDAD MENINGOCÓCICA.....	11
2.1.1 Definición de enfermedad meningocócica	11
2.1.2 Reseñas históricas.....	11
2.1.3. Epidemiología de la enfermedad meningocócica	12
2.1.3.1. Visión global.....	12
2.1.3.2. Situación en España	14
2.1.4. Características microbiológicas.....	19
2.1.5. Factores de riesgo de la enfermedad meningocócica.....	22
2.1.5.1. Edad	22
2.1.5.2. Sexo.....	22
2.1.5.3. Mecanismos inespecíficos de resistencia	22
2.1.5.4. Inmunidad natural	23
2.1.5.5. Alteraciones específicas del sistema inmunitario	23
2.1.5.6. Factores geográficos y estacionales	23
2.1.5.7. Factores ambientales	24
2.1.5.8. Hacinamiento	24
2.1.5.9. Infecciones respiratorias	25
2.1.5.10. Mecanismos inherentes a la bacteria.....	25
2.1.5.11. Polimorfismos genéticos.....	26
2.1.6. Fisiopatología e historia natural de la enfermedad	34
2.1.6.1. El papel del lipopolisacárido.....	36
2.1.6.2. Mediadores inflamatorios	37
2.1.6.3. Lesión endotelial y fuga capilar.....	39
2.1.6.4. El complemento	40
2.1.6.5. Coagulación y fibrinólisis.....	41
2.1.6.6. Disfunción circulatoria.....	41
2.1.7. Manifestaciones clínicas.....	42
2.1.8. Diagnóstico.....	43
2.1.9. Intervenciones terapéuticas	44

2.1.9.1.	Objetivo del tratamiento.....	44
2.1.9.2.	Antibióticos.....	45
2.1.9.3.	Tratamiento del shock séptico meningocócico	48
2.1.9.3.1.	Oxigenoterapia.....	48
2.1.9.3.2.	Acceso vascular	48
2.1.9.3.3.	Fluidoterapia.....	48
2.1.9.3.4.	Soporte vasoactivo	49
2.1.9.3.5.	Corticoides	49
2.1.9.3.6.	Calcio.....	50
2.1.9.3.7.	Otros.....	50
2.1.9.4.	Estrategias dirigidas al control de la cascada inflamatoria.....	51
2.1.9.4.1.	Proteína bactericida-permeabilizante (BPI).....	51
2.1.9.4.2.	Anticuerpo ha-1a	51
2.1.9.4.3.	Análogo del lípido A, E-5531	52
2.1.9.4.4.	Otros anticuerpos.....	52
2.1.9.5.	Terapias dirigidas a tratar las alteraciones de la coagulación	52
2.1.9.5.1.	Proteína C activada	52
2.1.9.5.2.	Antitrombina	53
2.1.9.5.3.	Factor activador del plasminógeno (t-pa).....	53
2.1.9.5.4.	Sanguijuelas de uso medicinal.....	53
2.1.9.5.5.	Otros.....	54
2.1.9.6.	Terapias dirigidas al aclaramiento de moléculas pro-inflamatorias de la sangre	54
2.1.9.6.1.	Recambio sanguíneo total o plasmático: plasmaféresis.....	54
2.1.9.6.2.	Hemofiltración	54
2.1.9.7.	Tratamiento de la coagulación intravascular diseminada (CID).....	55
2.1.9.8.	Estrategias terapéuticas que inducen vasodilatación.....	56
2.1.9.9.	Otras estrategias terapéuticas	56
2.1.9.10.	Tratamiento de la meningitis.....	57
2.1.10.	Declaración, control y prevención.....	57
2.1.10.1.	Declaración obligatoria.....	57
2.1.10.2.	Encuesta epidemiológica	58
2.1.10.3.	Profilaxis primaria.....	58
2.1.11.	Pronóstico de la enfermedad meningocócica.....	63
2.2.	GENÉTICA Y ENFERMEDAD.....	65
2.2.1.	Variación genética: mutación y polimorfismo	65
2.2.2.	ADN mitocondrial.....	65
2.2.2.1.	La mitocondria.....	65
2.2.2.2.	Arquitectura del ADN mitocondrial	67
2.2.2.3.	Características específicas de la genética mitocondrial	70

2.2.2.4.	ADN mitocondrial y enfermedad	72
2.2.2.5.	Mitocondria y sepsis	74
2.2.2.6.	ADN mitocondrial y sepsis	75
2.2.3.	Estudios de asociación y enfermedad multifactorial	76
2.2.3.1.	Estudios de casos y controles	77
2.2.3.2.	Selección de SNPs	77
2.2.3.3.	Genome-wide association studies (GWAS)	78
3.	JUSTIFICACIÓN	79
4.	HIPÓTESIS	83
5.	OBJETIVOS	87
6.	MATERIAL Y MÉTODOS	91
6.1.	MATERIAL Y MÉTODOS CLÍNICOS	93
6.1.1.	Diseño del estudio	93
6.1.2.	Tamaño muestral	96
6.1.3.	Participantes	96
6.1.3.1.	Casos	96
6.1.3.2.	Controles	97
6.1.4.	Intervención	97
6.1.5.	Aprobaciones éticas	97
6.1.6.	VARIABLES DEL ESTUDIO	98
6.1.6.1.	VARIABLES PRIMARIAS:	98
6.1.6.2.	VARIABLES SECUNDARIAS:	98
6.2.	METODOLOGÍA DE LABORATORIO	99
6.2.1.	Elección del método de genotipado	99
6.2.2.	Extracción de ADN y su cuantificación	100
6.2.3.	Amplificación	100
6.2.4.	Comprobación de los resultados	103
6.2.5.	Purificación	103
6.2.6.	Minisequenciación	103
6.2.7.	Purificación de los productos de secuenciación	104
6.2.8.	Genotipado	105
6.2.9.	Análisis estadístico	106
6.2.10.	Análisis filogenético	107
6.3.	ANÁLISIS GENÉTICO	108
6.3.1.	Selección del ADNmt	108
6.3.2.	Test de Ancestralidad	108

6.3.3.	Genotipado por minisequenciación	109
6.3.4.	Test de asociación de los diferentes SNPmt con las variables clínicas.....	110
6.4.	MATERIAL Y MÉTODOS ESTADÍSTICOS	111
7.	RESULTADOS.....	113
BLOQUE I: ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS PACIENTES AFECTOS DE		
	ENFERMEDAD MENINGOCÓCICA	115
7.1.	CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA	117
7.1.1.	Características demográficas de la muestra	117
7.1.2.	Antecedentes familiares y personales de interés.....	120
7.1.3.	Estado vacunal de los pacientes incluidos en el estudio	121
7.1.4.	Características clínicas y evolutivas	122
7.1.5.	Características microbiológicas.....	128
7.1.5.1.	Gram.....	128
7.1.5.2.	Serología	128
7.1.5.3.	Cultivo.....	128
7.1.6.	Características analíticas de los pacientes con enfermedad meningocócica	129
7.1.7.	Tratamiento administrado en los pacientes afectados de enfermedad meningocócica	130
7.2.	CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES FALLECIDOS	132
7.2.1.	Características demográficas y antecedentes familiares y personales de enfermedad	132
7.2.2.	Características clínico- evolutivas	133
7.2.3.	Tratamiento administrado en los pacientes fallecidos	137
BLOQUE II: ANÁLISIS DEL ADN MITOCONDRIAL.....		
	139	
7.3.	RESULTADO DEL ANÁLISIS GENÉTICO	141
7.3.1.	Correlación de las variables clínicas con los genotipos encontrados	141
7.3.1.1.	Valoración de la ancestralidad de los pacientes	141
7.3.1.2.	Evaluación de la posible asociación entre los haplogrupos del ADNmt y las variantes clínico-epidemiológicas	143
8.	DISCUSIÓN.....	147
8.1.	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y EPIDEMIOLÓGICAS.....	149
8.2.	POLIMORFISMOS GENÉTICOS COMO FACTORES DE RIESGO DE LA ENFERMEDAD MENINGOCÓCICA	154

8.3. POSIBLES LIMITACIONES DE LOS ESTUDIOS GENÉTICOS DE ASOCIACIÓN	157
9. CONCLUSIONES.....	161
10. PERSPECTIVAS FUTURAS	165
11. BIBLIOGRAFÍA	171
ANEXO I	193
A. Protocolo de recogida de datos.	195
B. Consentimiento informado.....	210
C. Hoja de información para las familias.	213
D. Aprobaciones éticas.	215
a. Comité de ética de la Universidad de Santiago de Compostela	215
b. Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia	216
c. Aprobación de la sociedad española de cuidados intensivos pediátricos.	217
ANEXO II: Relación de publicaciones y actividades científicas más relevantes derivadas de la realización de la tesis doctoral y de sus resultados.....	219
A. Web del estudio genético de la enfermedad meningocócica	221
B. Artículos publicados	223

RESUMEN

Antecedentes: La enfermedad meningocócica es la principal causa de muerte por infección en la infancia en los países industrializados. A pesar de los avances preventivos y terapéuticos, en el mundo se producen aproximadamente, 500.000 casos de enfermedad meningocócica invasiva, que causan más de 50.000 muertes al año. La gravedad del cuadro, así como el patrón de comportamiento son impredecibles. El estrecho período de ventana en el que es efectivo el tratamiento y su alta tasa de secuelas importantes la convierten en la enfermedad infecciosa bacteriana más temida. La expresión clínica y el pronóstico vendrán determinados por una compleja interacción entre los factores del huésped y el microorganismo. Entre ellos, se han señalado diferentes polimorfismos genéticos que podrían desempeñar un papel relevante en la susceptibilidad y el pronóstico del huésped frente a la enfermedad meningocócica.

El ADN mitocondrial (ADNmt) se ha relacionado específicamente con la susceptibilidad a la sepsis y el shock séptico, motivo por el que la enfermedad meningocócica podría tener también ahí un sustrato genético.

Objetivos: El objetivo principal de este proyecto es la identificación de determinantes genéticos mitocondriales y clínico-epidemiológicos que pudiesen influir en el patrón de respuesta individual a la infección meningocócica en la edad pediátrica.

Material y métodos: Se llevó a cabo un estudio multicéntrico y prospectivo a través de una red nacional creada específicamente para la realización del proyecto. Esta red -la red nacional para el estudio de la enfermedad meningocócica (red ESIGEM - www.esigem.org)- contó con la participación de 42 unidades de cuidados intensivos pediátricos del país durante el periodo comprendido entre octubre de 2005 y noviembre de 2009. El trabajo consta de una fase de análisis de 221 variables clínico-epidemiológicas de los pacientes afectados de enfermedad meningocócica ingresados en dichas unidades y, otra fase de análisis del genotipo mitocondrial de estos pacientes. En todos los casos se analizó el ADNmt con el fin de buscar marcadores potencialmente relacionados con la forma y severidad de presentación de la enfermedad y su pronóstico.

Resultados: Durante el periodo de estudio se recogieron un total de 366 casos de enfermedad meningocócica, 203 (55.3%) niños y 125 (34.1%) niñas. La edad media fue de 3.7 (3.9) años. El territorio norte de la Península Ibérica concentró 2/3 de los casos recogidos. Entre los antecedentes, en 23 (6,3%) pacientes había habido otro

caso de enfermedad meningocócica en la familia y en 35 (9.5%) de meningitis; 15 (6.8%) habían presentado otro cuadro de infección grave previamente. Los diagnósticos de entrada fueron: sepsis meningocócica en 225 (47.4%), meningitis meningocócica en 67 (14.1%) y sepsis meningocócica con meningitis en 183 (38.5%). El tiempo medio desde la aparición de los síntomas hasta el ingreso fue de 11 (7.4) horas y el tiempo medio transcurrido desde la aparición de petequias al ingreso fue 5.49 (5.42) horas. 273 (74.4%) ingresaron en la unidad de cuidados intensivos siendo el tiempo medio de estancia en la unidad de 3.87 (6.07) días. La forma clínica de presentación más frecuente fue la púrpura petequeal (64.6%). 13 (3.5%) pacientes fallecieron siendo la causa más frecuente de muerte el síndrome de disfunción orgánica múltiple (6 casos). 8 (2.2%) pacientes precisaron injertos y a 9 (2.45%) se les realizó amputación de alguna falange o extremidad. En 233 (63.66%) casos se aisló la bacteria; 197 (84.54%) meningococo B, 16 (6.86%) meningococo C, 1 (0.45%) meningococo W135. En cuanto al tratamiento, 323 (88.25%) precisaron expansión de volumen, en 138 (37.7%) se empleó soporte inotrópico, el antibiótico más utilizado fue la cefotaxima en 171 (46.6%); se utilizó corticoterapia en 115 (31.4%) casos; 209 (57.1) precisaron oxigenoterapia. En 11 (3%) casos se realizó hemofiltración veno-venosa continua. En relación al análisis del ADN mitocondrial y tras comparar el genotipo de los casos con dos grupos controles, no se encontraron determinantes genéticos que aumentaran las susceptibilidad a la enfermedad meningocócica o que se relacionaran con un peor pronóstico clínico. La sobre-expresión de la variante SNPmt **G11719A** hallada tras la comparación de los casos con el primer grupo control (GC1) no fue observada tras la comparación de los casos con un segundo grupo control (GC2), por lo que no puede establecerse asociación entre dicha variante y la enfermedad meningocócica. El distrés respiratorio tipo adulto parecía estar asociado (valor nominal) con el haplogrupo U. No obstante, esta asociación se perdió al ajustar el análisis mediante la corrección de Bonferroni. Dada la probabilidad de encontrar una falsa asociación positiva entre un determinado SNP y la enfermedad meningocócica, y a falta de una segunda/tercera cohorte de replicación/confirmación, dicha asociación debe ser al menos replicada en otros grupos control independientes. Las asociaciones espurias pueden ocurrir con facilidad en los estudios de asociación debido a los problemas de estratificación poblacional no detectados. El riesgo de asociaciones falsamente positivas es mayor en los estudios de ADNmt dado que el tamaño efectivo de población es más bajo que en los estudios de ADN nuclear, lo que deriva en una mayor diferenciación inter-poblacional. Son necesarios AIMS (ancestry informative

markers) más sensibles para la estratificación estricta de grupos poblacionales limitados al territorio español.

Conclusiones: Nuestro estudio excluye con rotundidad el sustrato genético mitocondrial de la enfermedad meningocócica y deja en entredicho las asociaciones previamente referidas en la literatura entre enfermedad bacteriana grave y ADN mitocondrial. Aunque la enfermedad meningocócica se presenta con mayor prevalencia en la zona norte de la Península Ibérica, no hemos identificado factores genético-mitocondriales o ambientales que expliquen estas variaciones geográficas en la prevalencia de la enfermedad.

1. INTRODUCCIÓN

“Todo lo que hice en mi vida es solamente una gota en el océano, pero me consuela pensar que si yo no lo hubiera hecho, al océano le faltaría mi gota”.

(Santa Teresa de Calcuta)

La enfermedad meningocócica es la principal causa de muerte por infección en la infancia en los países industrializados. Aproximadamente, alrededor del mundo ocurren 500.000 casos de enfermedad meningocócica invasiva causando más de 50.000 muertes al año. A parte de las epidemias, cada año se registran alrededor de 1.2 millones de casos de meningitis bacteriana, de los que alrededor de 135.000 son fatales: 500.000 de los afectados y 50.000 de los que fallecen son debidos al meningococo³. En España se registran alrededor de 1000 casos de enfermedad meningocócica cada año, con una mortalidad del 10% (fuente ISCIII - datos de enfermedades EDO), lo que supone decenas de fallecimientos cada año.

Los niños representan uno de los grupos más susceptibles de padecer la enfermedad sobre todo en los rangos de edades comprendidas entre 1-3 años y 12-15 años, donde se sitúa la tasa de mayor incidencia, y la mortalidad es más alta³.

La mayoría de los casos sin tratamiento tendrán un desenlace fatal: la meningitis meningocócica tiene un 100% de mortalidad sin el tratamiento adecuado. En países industrializados la tasa de letalidad es del 5-10% mientras en África es cercana al 40%. La tasa de letalidad por septicemia fulminante puede exceder del 15-20%. Además, cerca de un 20-25% de los supervivientes a la meningitis meningocócica sufrirán secuelas neurológicas (sordera, epilepsia, retraso mental,...) y, de los que sobreviven a la púrpura fulminante desde un 20 a un 60% pueden tener algún tipo de secuela (amputaciones, injertos cutáneos,...)³. Por otro lado, la gravedad del cuadro es impredecible y, el estrecho período de ventana en el que es efectivo el tratamiento la convierte en la enfermedad infecciosa bacteriana más temida.

Desde el punto de vista epidemiológico, es una enfermedad pleomórfica, con diferentes tasas de incidencia, distribución de serogrupos, expresión clínica y grupos de riesgo dependiendo de la zona geográfica y la estación del año en que se produzca la infección. Los factores que determinan la aparición de una cepa y el patrón de comportamiento de la enfermedad (epidemia, endemia, hiper-endemia) no están plenamente aclarados, lo que continúa siendo un importante reto para la Salud Pública de los países industrializados^{3,4}.

Existen todavía muchos interrogantes en la epidemiología y el comportamiento de la enfermedad meningocócica que hacen atractivo su estudio tales como, la relación entre la condición de portador y la posibilidad de enfermar, la variabilidad del período de incubación, los condicionantes de la respuesta inmunológica frente al agente causal, la periodicidad de los ciclos multianuales, los

cambios en la distribución de serotipos y las posibilidades de predecir la evolución de la enfermedad, entre otros.

La genética a través de los estudios de asociación ha contribuido en los últimos años al avance del conocimiento de la fisiopatología de múltiples enfermedades². El estudio de los genes implicados en el desarrollo de estas enfermedades nos permite predecir el riesgo, susceptibilidad, pronóstico o resistencia a desarrollarlas^{5,6}. En el momento actual ya se han publicado estudios de asociación genética llevados a cabo en algunas enfermedades importantes por su alta prevalencia en la población infantil⁷⁻¹⁰ (otitis media, asma, diabetes tipo I, celiacía, etc.), y otras de especial interés por su alta mortalidad y/o morbilidad en este grupo de edad^{5,11-13} (enfermedad meningocócica, enfermedad neumocócica). Algunos autores defienden la presunta asociación de una variante genética con un mayor riesgo a infección meningocócica¹⁴; individuos afectados tienen además un riesgo incrementado a desarrollar sepsis o por el contrario otras variantes se relacionan con menor riesgo de padecer la enfermedad.

La evolución del ADN humano se ha visto influenciada por las enfermedades infecciosas que han ido padeciendo los hombres a la largo de la historia^{6,12,15}. Si bien la mayoría de los estudios han sido dirigidos al análisis de la respuesta inmune del huésped, la recuperación tras la sepsis está directamente relacionada con la reserva fisiológica del huésped que depende de manera crítica de la función mitocondrial¹⁶. El ADN mitocondrial (ADN mt) posee características que lo convierten en objeto de estudio en estudios de asociación genética. Además, existen evidencias recientes que sugieren que ciertos haplogrupos del ADNmt tienen una importancia funcional que aumentan la susceptibilidad de padecer cierto tipo de enfermedades^{17,18}.

En el presente estudio, se abordarán los aspectos clínicos, epidemiológicos y genéticos y, su posible influencia en la forma de presentación clínica y pronóstica de la enfermedad meningocócica en la edad pediátrica.

2. REVISIÓN DEL PROBLEMA

“La ciencia ganará nuevas zonas a lo que hoy parece inexplicable. Pero las rayas fronterizas del saber, por muy lejos que se eleven, tendrán siempre delante un infinito mundo de misterio”.

(Gregorio Marañón)

2.1. ENFERMEDAD MENINGOCÓCICA

2.1.1 Definición de enfermedad meningocócica

La enfermedad meningocócica es un cuadro clínico causado por la bacteria *Neisseria meningitidis*, que puede presentarse como meningitis y/o meningococemia y progresar rápidamente a púrpura fulminante, shock y muerte^{4,19}. Dentro de la denominación de enfermedad meningocócica se incluyen, junto a la meningitis cerebrospinal epidémica, diversos cuadros clínicos transmisibles producidos por *Neisseria Meningitidis* que no siempre producen afectación meníngea¹⁹. Con el fin de unificar actuaciones en el control y la lucha contra la enfermedad meningocócica, el Grupo de Vigilancia de la Enfermedad Meningocócica de Estados Unidos elaboró unas definiciones arbitrarias de caso índice o primario, caso coprimario y caso secundario que fueron aceptadas por el Grupo de Expertos en Meningococos de la Dirección General de Salud Pública del Ministerio de Sanidad de España²⁰.

- **Caso primario o índice** es aquel que se presenta aislado y sin relación con otro caso anterior.
- **Caso coprimario** es el que aparece en un contacto íntimo o conviviente del enfermo dentro de las primeras 24 horas a partir de la hospitalización del caso primario.
- **Caso secundario** es el que se presenta en un contacto íntimo o conviviente del enfermo y comienza 24 horas después de la hospitalización del caso primario. La definición anterior limitaba el tiempo hasta 31 días, debido a que tradicionalmente se había observado que el 60-70% de los casos secundarios se producían dentro de la semana siguiente a la aparición del primer caso, y el 90% se producían en las primeras dos semanas. Recientemente se ha observado que la mitad de los casos secundarios aparecen después de 5 semanas o más de la presentación del primer caso.

2.1.2 Reseñas históricas

Aunque es posible que ya se conociese en la Antigüedad, las primeras referencias históricas de la enfermedad meningocócica datan del siglo XVI. No obstante, el comienzo de la historia de la enfermedad meningocócica parte de un

brote de una enfermedad infecciosa que causó 33 muertes de en Ginebra en el año 1805 siendo descrita ese misma época por Vieusseux²¹. En 1884, los patólogos Marchiafava y Celli observaron por primera vez un micrococo ovalado en una muestra de LCR²². Más tarde, en 1887 Anton Weichselbaum aisló por primera vez la bacteria a partir del líquido cefalorraquídeo de un paciente afecto de meningitis purulenta. Dicha bacteria fue denominada *Neisseria intracellularis*²³. En 1901, Albrecht y Ghon demostraron su presencia en la nasofaringe. El descubrimiento del meningococo motivó los primeros ensayos vacunales utilizando la totalidad del germen, los cuales no tuvieron éxito. Dopler, en 1909 describió la existencia de dos grupos serológicos diferentes, que denominó meningococo y parameningococo, clasificación que se siguió de otras muchas. En 1913, Flexner introdujo la seroterapia en el tratamiento y redujo la letalidad del 80 al 30%, tratamiento que sería relegado, en 1939, por la llegada de las sulfamidas, las cuales redujeron nuevamente la letalidad al 20%²⁴.

N. meningitidis es el agente causal de un amplio espectro de enfermedades con diferentes pronósticos. Antes de 1920, la enfermedad meningocócica causaba la muerte en más del 70% de los afectados. A principios de siglo, gracias a los trabajos con suero de caballo de los científicos Jochmann, en Alemania, y Flexner, en Estados Unidos, así como la llegada de la era antibiótica se consiguió reducir la mortalidad hasta casi el 40%²⁵. Sin embargo y desde entonces, la mortalidad por enfermedad meningocócica no se ha conseguido reducir a pesar del adecuado tratamiento antibiótico y la vacunación.

2.1.3. Epidemiología de la enfermedad meningocócica

2.1.3.1. Visión global

N. meningitidis es una de las principales causas de meningitis bacteriana, sepsis grave y shock séptico en todo el mundo. La enfermedad meningocócica representa la primera causa de muerte por infección en los países industrializados⁴. Se estima que alrededor del 10% de la población en circunstancias no epidémicas es portadora de este microorganismo²⁶, existiendo una importante variación según la edad de los pacientes: menos del 3% en niños menores de 4 años, del 24 al 37 % en jóvenes de 15 a 24 años, e inferior al 10% en los pacientes de edad avanzad²⁷.

Existen cinco serogrupos comunes (A, B, C, Y y W135) responsables del 90% de las infecciones por meningococo en todo el mundo (ver figura 1). En concreto, los serogrupos A, B y C son los agentes causales de la mayoría de los casos de enfermedad meningocócica, predominando los serogrupos B y C en Europa y América,

mientras que el A y el C en Asia y África²⁸⁻³⁰. Asia ha sido el foco de las mayores epidemias de los últimos 30 años (China 1979 y 1980, Vietnam 1977, Mongolia 1973-1974 y 1994-1995, Arabia Saudí 1987, Yemen 1988). Es destacable la epidemia ocurrida en el subcontinente Indio de 1983 a 1987. Entre 1987-1996, dicha epidemia se extendió a Oriente Medio causando la enfermedad a un grupo de peregrinos durante el Hajj a La Meca y se extendió a los países africanos²⁸.

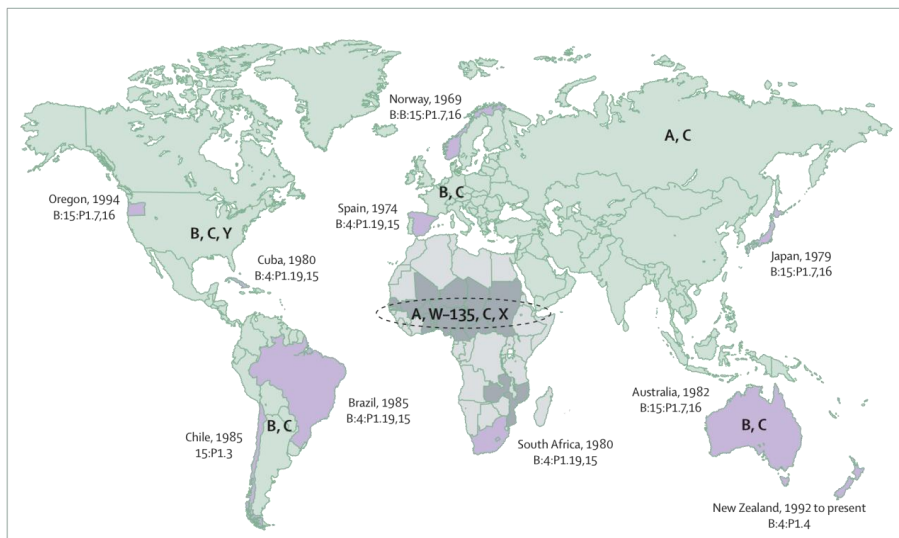


Figura 1. Distribución mundial de los distintos serogrupos de meningococo (Adaptado de Stephens et al 2007³¹)

Recientemente se ha incrementado el número de casos debidos al serogrupo Y, aislándose únicamente en Israel, Suecia y Estados Unidos. El serogrupo W135 representa tan sólo el 4% de todos los casos de enfermedad en Estados Unidos. En el año 2000 se declaró la existencia de un brote internacional debido al serogrupo W135 entre un grupo de peregrinos del “hajj” (peregrinación a La Meca) y sus contactos incluyendo habitantes de Estados Unidos³²⁻³⁴. También dicho serogrupo fue aislado en una epidemia que afectó a Burkina Faso durante los años 2002 y 2003³⁴.

Por otro lado, cabe citar el aumento inesperado de los casos de enfermedad meningocócica producidos por el serogrupo X que podría llegar a ocasionar una nueva epidemia³⁵.

La frecuencia de epidemias de enfermedad meningocócica depende del grupo clonal de la bacteria, así como de las diferencias socioeconómicas y las condiciones

medioambientales. El número de casos provocados por los diferentes grupos clonales varía según la edad³⁶.

La zona más afectada ha sido la región semi-árida del África sub-sahariana, bautizado por Lapeysonnie como “cinturón de la meningitis”, el cual se extiende desde Etiopía hasta Senegal. En esta región el serogrupo A representa una amenaza para la salud pública desde hace casi un siglo. Cada 8-12 años se producen brotes con una prevalencia de 500-5.000/100.000 habitantes. Tras el brote de 1995-6, se creó el Grupo Internacional de Coordinación para la Provisión de Vacunas para el Control de Epidemias de Meningitis. El principal objetivo de este grupo es asegurar el acceso rápido y equitativo a las vacunas y material de inyección con el fin de adecuar su uso cuando los recursos son limitados³⁷.

2.1.3.2. Situación en España

La vigilancia epidemiológica de la enfermedad meningocócica en España se realiza a través de la notificación a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica al tratarse de una enfermedad de declaración obligatoria (EDO). La evolución de la tasa de incidencia muestra por un lado, un nivel de endemia en torno a los 3 casos por cada 100.000 habitantes y año y, por otro, ondas epidémicas, siendo las más importantes la de 1962-65, 1971-72 y sobre todo la de 1979, año en que se alcanzó una tasa de 17,9 casos por 100.000 habitantes³⁸. Según el Sistema de Información Microbiológica del Centro Nacional de Microbiología, el serogrupo B ocasiona la mayor parte de los casos, siendo raros los aislamientos de serogrupos A y C. Del informe del Ministerio de Sanidad y Consumo sobre “Vacunas conjugadas frente a meningitis C”, se desprende que desde el inicio de los 90, se observó una tendencia creciente de las cepas del serogrupo C en regiones del oeste del país, sin elevación de la incidencia global de la enfermedad meningocócica. A partir de la temporada de 1995-96 se observó en regiones del noroeste del país además de un predominio del serogrupo C, un marcado aumento de la enfermedad, en concreto de la cepa 2b. También, se modificó el patrón epidemiológico de la enfermedad: mayor afectación de adolescentes y jóvenes, tendencia a “clusters” o agrupaciones de casos e incremento en la letalidad. Este incremento de incidencia se extendió a las Comunidades limítrofes durante la temporada de 1996-97, de forma que la tasa de incidencia de esa temporada en España ascendió hasta 5,8 casos por 100.000 habitantes y el serogrupo C pasó a representar el 73% de los casos confirmados en el país, con la consiguiente alarma social. Ese ascenso fue asociado con un crecimiento en la tasa de incidencia general de la enfermedad, que fue desigual en las diferentes comunidades autónomas. Esta situación condicionó que, en 14 de las 17

comunidades, desde diciembre de 1996 hasta finales de 1997, se decidiera realizar una campaña de vacunación entre los 2 y los 19 años de edad, utilizando la vacuna entonces disponible A+C. Dicha vacuna demostró una alta eficacia a corto plazo, aunque, tras un año especialmente los grupos de edades inferiores mostraron una rápida pérdida de anticuerpos protectores y, por tanto una rápida disminución de la eficacia, de tal forma que en años sucesivos se detectó un paulatino incremento en los valores de las tasas de ataque de la enfermedad. Esta observación resultó determinante para que, en otoño de 2000, poco después de obtener la licencia en España, se recomendara la inclusión en el calendario de una nueva vacuna frente al meningococo de serogrupo C. Esta vacuna se desarrolló según la misma estrategia de conjugación del polisacárido que se había seguido unos años antes con la *Haemophilus influenzae* tipo b. Al ser una vacuna conjugada, el tipo de respuesta es diferente: es inmunógena desde los 2 meses de edad, la respuesta que se obtiene es de larga duración, y tiene la capacidad de reducir las tasas de portadores generando inmunidad colectiva o de rebaño. Por este motivo, la vacuna conjugada previene la aparición de nuevos casos de enfermedad y, adicionalmente impide la transmisión del microorganismo. Este efecto, por el que aquellos colectivos que bien por edad o bien por otras causas, no han recibido la vacuna se ven protegidos de forma indirecta, probablemente constituye hoy día la mejor estrategia para el control de la enfermedad. Tras 5 años de aplicación en España de las nuevas vacunas conjugadas, el descenso en el número de casos provocados por el serogrupo C ha sido muy significativo, situándose dicho descenso en torno al 90% en 2004. La caída en el número de casos de este serogrupo no ha venido acompañada de un aumento en las tasas del serogrupo B. Los serogrupos Y y W135 presentan un mayor número de casos en los últimos años, pero este aumento es aún poco significativo, por lo que podemos decir que no se ha observado, de momento un fenómeno de reemplazamiento del serogrupo C por otros. La inexistencia de un criterio claro de vacunación, condujo finalmente a la realización de campañas de inmunización activas de la población de 18 meses a 19 años con la vacuna de polisacáridos A y C por la mayoría de las Comunidades Autónomas. Durante el año que siguió a la intervención se observó un descenso global de la Enfermedad Meningocócica del 45% y, aunque disminuyó en todos los grupos de edad, la reducción más importante se produjo en el grupo de 2 a 19 años. Ese mismo año las defunciones debidas al serogrupo C se redujeron en un 67%. Dos años después de la vacunación, en la temporada 1998-1999 según el informe anual del Centro Nacional de Epidemiología, se mantuvo el descenso de incidencia por serogrupo C. Este descenso no había sido homogéneo territorialmente: el

serogrupo C continuaba siendo el serotipo dominante en cuatro Comunidades Autónomas, las tres que no realizaron campaña de vacunación y Baleares (en esta última se había relacionado con el intenso trasiego de turistas procedentes de Europa) y, su incidencia ha aumentado en Andalucía con respecto a la temporada anterior. En las Comunidades Autónomas en las que se vacunó a la población, la incidencia se redujo y el patrón estacional desapareció^{38,39}.

En la temporada 1999-2000 aumentó la incidencia de Enfermedad Meningocócica un 22% con relación al mismo período de la temporada anterior. Este aumento fue significativo en cinco comunidades autónomas: Canarias, Madrid y Extremadura a expensas del serogrupo B y, Cataluña y Comunidad Valenciana a expensas de los serogrupos B y C. El serogrupo C se había aislado en el 35% de los casos de enfermedad meningocócica declarados en el conjunto nacional. De los 170 casos con aislamiento de serogrupo C, en 18 existía antecedente de vacunación, correspondiendo casi la mitad de éstos a edades entre 2 y 4 años, lo que pone en evidencia la escasa duración de la inmunidad en estas edades³⁸.

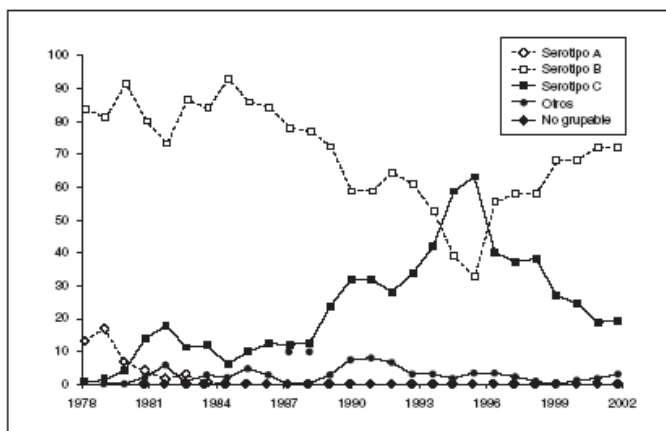


Figura 2. Epidemiología de la enfermedad meningocócica en España en la temporada 1978-2002 (Adaptado de Vázquez Moreno et al³⁸).

La temporada siguiente al 2002 viene marcada por la realización de la vacunación en adolescentes en las comunidades autónomas que todavía no lo habían hecho⁴⁰. En la Figura 2 se observa cómo el número de casos totales de enfermedad meningocócica ha descendido de 1.624/año a 822/año desde 1978 hasta 2002 a expensas de los casos debidos al meningococo C. No obstante, obsérvese en la tabla 1

cómo la tasa de incidencia de la enfermedad debida al meningococo B se mantiene “congelada” desde el año 2000^{38,41}.

SEROGRUPO	PRE-VACUNAL		POST - VACUNAL												% cambio de 2005-2006 con 1999-2000
	1999-2000		2000-2001		2001-2002		2002-2003		2003-2004		2004-2005		2005-2006		
	Casos	Tasas	Casos	Tasas	Casos	Tasas	Casos	Tasas	Casos	Tasas	Casos	Tasas	Casos	Tasas	
Total confirmados	1.116	2,80	716	1,78	898	2,17	747	1,78	743	1,74	697	1,61	603	1,38	-46,0
Sg B	615	1,54	472	1,17	554	1,34	489	1,16	517	1,21	502	1,16	464	1,06	-24,6
Sg C	412	1,03	163	0,40	236	0,57	173	0,41	148	0,35	124	0,29	86	0,20	-79,1
No grupables	62	0,16	48	0,12	66	0,16	55	0,13	41	0,10	38	0,09	22	0,05	-64,5
Otros serogrupos	20	0,05	20	0,05	24	0,06	22	0,05	30	0,07	27	0,06	18	0,04	-10,0
Sg. desconocido	7	0,02	13	0,03	18	0,04	8	0,02	7	0,02	6	0,01	13	0,03	85,7
Total probables	508	1,27	256	0,64	262	0,63	196	0,47	214	0,50	237	0,55	219	0,50	-56,9
Total	1.624	4,07	972	2,41	1.160	2,81	943	2,25	957	2,24	934	2,16	822	1,88	-49,4

Tabla 1. Enfermedad meningocócica en España en las temporadas 1999-2000 a 2005-2006. Casos y controles por 100.000 habitantes según el diagnóstico microbiológico. Adaptado del Boletín Epidemiológico del Ministerio de Sanidad y Consumo⁴¹.

En la temporada 2005-2006, las tasas de incidencia de casos confirmados más elevados correspondieron a Cantabria, Navarra, Ceuta y País Vasco. Estas tasas se explican en parte por la elevada incidencia de serogrupo B en estas comunidades. En esta temporada, que supone la sexta desde la introducción de la vacuna conjugada, las tasas debidas al serogrupo C fueron muy bajas en todas las comunidades autónomas. Las tasas más altas correspondieron a Galicia y Navarra. La tasa de incidencia en Galicia ha superado la tasa mediana del quinquenio previo. La incidencia más elevada de casos confirmados correspondió a los menores de 5-9 años (ver tabla 2). Las tasas más altas debidas al serogrupo B correspondieron a los menores de 5 años lo cual se ha repetido en las últimas temporadas⁴¹.

GRUPOS DE EDAD	PRE-VACUNAL		POST-VACUNAL					
	1999-2000		2003-2004		2004-2005		2005-2006	
	Casos	Tasas	Casos	Tasas	Casos	Tasas	Casos	Tasas
< 1	218	56,47	131	29,37	115	25,29	104	22,50
1 - 4	342	23,17	160	9,46	180	10,29	159	8,85
5 - 9	142	7,30	69	3,51	46	2,29	54	2,62
10 - 14	74	3,54	54	2,57	31	1,49	21	1,01
15 - 19	108	4,22	84	3,59	68	2,95	60	2,63
20 - 24	46	1,44	48	1,61	31	1,07	39	1,40
25 - 44	63	0,50	80	0,57	74	0,52	60	0,41
45 - 64	64	0,72	50	0,51	72	0,71	55	0,53
> 65	59	0,88	66	0,92	79	1,09	51	0,69
Total	1.116	2,80	742	1,74	696	1,61	603	1,38

Tabla 2. Enfermedad Meningocócica en España en las temporadas 1999-2000 a 2003-2006. Casos confirmados y tasas por 1.000.000 habitantes por grupos de edad. Adaptado del boletín epidemiológico⁴¹.

En cuanto a las tasas de letalidad, se produjeron un total de 86 defunciones, 75 en casos confirmados, siendo la letalidad global de 10,5-12,4% para los casos confirmados y se ha mantenido por encima del 11% en las últimas 5 temporadas. La letalidad más alta la presentaron los casos producidos por el serogrupo C, 24,4%. La letalidad debida a los casos producidos por el serogrupo B fue de 10,8% siendo la más alta en los últimos siete años⁴¹ (Ver tabla 3).

SEROGRUPO	1999-2000		2005-2006	
	Defunciones	Letalidad	Defunciones	Letalidad
Total confirmados	106	9,50	75	12,44
Sg B	45	7,32	50	10,78
Sg C	54	13,11	21	24,42
No grupables	6	9,68	2	9,09
Otros serogrupos	1	5,00	1	5,56
Sg. desconocido	0	0,00	1	7,69
Total probables	28	5,51	11	5,02
Total	134	8,25	86	10,46

Tabla 3. Defunciones totales y letalidad según el diagnóstico microbiológico. Temporadas 1999-2000 y 2005-2006⁴¹.

La forma clínica de presentación más frecuente en los casos confirmados fue la sepsis (con o sin meningitis) en el 62%. En los casos probables el porcentaje de casos que cursaron con meningitis fue ligeramente superior a los que cursaron con sepsis, si bien esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Los cuadros de enfermedad meningocócica confirmados que cursaron con sepsis (con o sin meningitis) fueron más graves que los que cursaron sólo con meningitis. Analizando el serogrupo, la letalidad debida al serogrupo B fue menor que la del C en los cuadros de sepsis así como los que cursaron con meningitis.

En cuanto al fenotipo (serotipo y serosubtipo) de las cepas que han causado enfermedad un 34% de los casos fue debido al serogrupo B y un 21% de los C. El serosubtipo P1.15 (20%) y las cepas no subtipables (16%) fueron las más frecuentes entre las cepas del serogrupo B para las que se dispone de esta información. Los serosubtipos más frecuentes del serogrupo C fueron el P1.5 (50%) y las cepas no subtipables (28%). El serotipo 2a ha pasado de representar el 3% de las cepas subtipadas del serogrupo B en la temporada 2001-2002 al 12% en la última temporada. La letalidad de las cepas del serotipo 2a ha sido más elevada que la causada por el resto de los serotipos, si bien la diferencia no ha sido estadísticamente significativa.

En resumen, en España, la temporada 2005-2006 ha sido la primera en la que descendieron de manera global los casos en cohortes que no fueron objeto de vacunación. Este efecto puede explicarse por la inmunidad de grupo conferida por la vacuna al haberse completado, prácticamente en todas las comunidades, las campañas de vacunación en adolescentes, principales portadores de la bacteria. El predominio del serogrupo B vuelve a ser general en todo el país. Los cambios observados en la incidencia de este serogrupo no han sido relevantes y el descenso observado (25%, si comparamos con la temporada 1999-2000) probablemente se debe a los cambios cíclicos que afectan a la evolución de la enfermedad^{40,41}. El número de casos debido a otros serogrupos se ha mantenido estable. Aunque el porcentaje de casos probables ha disminuido, suponen un importante número en el total de casos declarados. La utilización de la reacción en cadena de la polimerasa en el diagnóstico de casos en los que el cultivo es negativo es una práctica poco frecuente en algunas CCAA por lo que el número de casos de enfermedad meningocócica podría estar infraestimado lo cual podría tener relevancia en la evaluación de la evolución de la enfermedad y el impacto de la vacuna.

2.1.4. Características microbiológicas

Neisseria Meningitidis, comúnmente llamado meningococo, es una bacteria aeróbica, capsulada y gram-negativa; tiene morfología de diplococo arriñonado, no esporulado y, generalmente, posee fimbrias. Se cultiva en medios enriquecidos con sangre, con cierta humedad y en una atmósfera con 2-8% de CO₂ a una temperatura de 37°C²⁴ (Figura 3).



Figura 3. Fotografía del meningococo. Obsérvese la morfología de diplococo arriñonado y la presencia de fimbrias. (Adaptado de bioweb.uwlax.edu/)

El hombre es el único reservorio conocido de esta especie que se aísla en la nasofaringe de individuos sanos en porcentajes que oscilan entre el 4 y el 20%, variación asociada a factores como la edad, las condiciones de endemia o epidemia, etc.⁴². En los casos de enfermedad invasiva, se aísla de líquido cefalorraquídeo (LCR), sangre, Petequias, líquido sinovial, etc. En el caso de aislamiento en la nasofaringe, al no ser una muestra estéril, se hace necesario eliminar otra flora acompañante, incluyendo *Neisseria saprofitas* y otras especies comensales. En este caso el medio selectivo utilizado es el descrito por Thayer y Martin, en 1966, consistente en agar chocolate suplementado con vancomicina, nistatina y colistina. El crecimiento en este tipo de medio constituye la base de la diferenciación inicial entre las 2 especies patógenas ya mencionadas y el resto de las especies, que son saprofitas. Las especies patógenas crecen en medio selectivo mientras que las saprofitas no, aunque hay que señalar que *Neisseria lactamica* y *Neisseria polyscharea* sí crecen al igual que puede hacerlo un limitado porcentaje del resto de las especies comensales. La identificación de *N. meningitidis* y su diferenciación de otras *Neisseria* se realiza fundamentalmente por diferencias en la degradación de azúcares (glucosa, maltosa, sacarosa, fructosa y lactosa) y los perfiles enzimáticos. El meningococo degrada la glucosa y la maltosa pero no la sacarosa la fructosa y la lactosa. Existen dos enzimas cuya detección es de especial relevancia en el género *Neisseria*. Así, la presencia de gamma glutamilaminopeptidasa es casi exclusiva de *N. meningitidis* mientras que la beta-galactosidasa la produce únicamente *N. lactamica*³⁸.

El meningococo presenta una serie de antígenos característicos de especie (Figura 4) y, algunos de ellos se han utilizado para su tipificación. Los más relevantes son el polisacárido capsular, que define el serogrupo de las cepas, las proteínas de membrana clase 2 y 3 por las que se clasifican en diferentes serotipos y las proteínas de membrana de clase 1 que definirán los serosubtipos. Adicionalmente se ha utilizado el lipopolisacárido para clasificar las cepas en inmunotipos o lipopolisacáridotipos, aunque sólo unos pocos laboratorios recurren a este antígeno como marcador. Así por ejemplo, el meningococo denominado B:2b:P1.5,12:L3,7,9 indicará el serogrupo: serotipo: serosubtipo: inmunotipo que podrán ser determinadas a partir de sueros específicos con anticuerpos monoclonales²⁷. Algunos de estos antígenos son la base del desarrollo de vacunas.

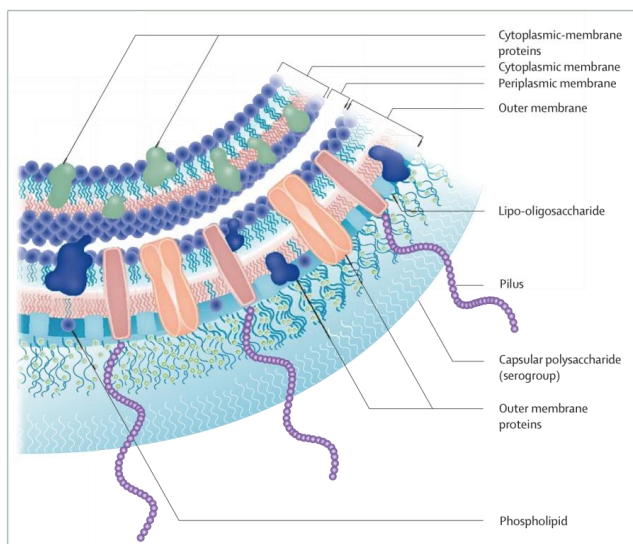


Figura 4. Esquema de la membrana del meningococo. Adaptado de Stephens et al^{31,43}.

De acuerdo con los componentes de su cápsula polisacárida se clasifican en **serogrupos**. Si bien se han descrito 13 serogrupos (A, B, C, D, X, Y, Z, 29E, W135, H, I, K y L), la mayoría de los casos están provocados por los serogrupos A, B y C. La cápsula polisacárida está compuesta de homopolímeros o heteropolímeros consistentes en combinaciones de monosacáridos, disacáridos o trisacáridos. Los principales polisacáridos capsulares derivan del ácido siálico, excepto el serogrupo A. En éste la cápsula está compuesta de unidades de repetición de N-acetilmanosamina-1-fosfato³⁸.

Los meningococos poseen además otro tipo de antígenos como las fimbrias o Pili que son apéndices filamentosos, de los que hay diferentes tipos. Las fimbrias o pili están constituidos por una o dos cadenas de subunidades proteicas ligadas entre sí formando una estructura tubular. Inducen una fuerte respuesta de anticuerpos. Existen diferentes tipos de fimbrias: las de las neisserias patógenas son más largas que las de las cepas apatógenas. Las células nasofaríngeas, especialmente las columnares, no ciliadas, poseen, al parecer, más receptores para las fimbrias meningocócicas que otras células de las superficies mucosas.

Cabe destacar también el antígeno H.8, lipoproteína de membrana externa, y las proteínas reguladoras de hierro (IRP), de las que el meningococo expresa 4 ó 5, que incluyen receptores específicos para la transferrina y la lactoferrina humana;

actualmente se contemplan como moléculas candidatas para el desarrollo de vacunas, que pueden impedir el crecimiento del meningococo al bloquear la captura de hierro^{20,44}.

Neisseria Meningitidis tiene la capacidad de modificar el material genético de su cápsula y por lo tanto cambiar del serotipo B al C y viceversa. Ello constituye un mecanismo importante de virulencia que repercute en la eficacia de las vacunas^{4,44,45}.

2.1.5. Factores de riesgo de la enfermedad meningocócica

2.1.5.1. Edad

Aunque la enfermedad puede afectar a todas las edades, la mayoría de los casos se presentan en niños y adolescentes, según el serogrupo responsable. El serogrupo B afecta sobre todo a los menores de 5 años; el serogrupo C tiene una distribución más bimodal, afectado también a los adolescentes (15-19 años); el serogrupo A afecta más a los adultos jóvenes (15-19, 25-44 y 10-14 años) y el serogrupo Y afecta fundamentalmente a mayores de 65 años^{4,20,24}.

La incidencia de la enfermedad en el neonato es baja, debido a la presencia de anticuerpos maternos; a estas edades las manifestaciones clínicas son extremadamente graves. Dentro del grupo de enfermos menores de 1 año, los de 6-9 meses son los más afectados y los menores de 3 meses los que tienen un cuadro más leve.

La mortalidad es mayor en los más jóvenes (0-3 años). El meningococo C en particular ocasiona una mayor mortalidad en los adolescentes y adultos jóvenes⁴¹.

2.1.5.2. Sexo

Se ha observado una mayor morbilidad en los varones (razón de masculinidad: entre 1.2 y 1.4), mientras la mortalidad es mayor en las mujeres (razón de masculinidad: 0.9)⁴.

2.1.5.3. Mecanismos inespecíficos de resistencia

Todo lo que disminuye la resistencia del individuo (hambre, fatiga, frío, etc,...) aumenta su susceptibilidad a la enfermedad meningocócica. Del mismo modo, tienen una gran importancia la integridad funcional y orgánica de la mucosa rinofaríngea (integridad de la capa celular epitelial, función ciliar, lisozimas, flora comensal,...)^{4,19}.

2.1.5.4. Inmunidad natural

La inmunidad humoral desempeña un papel trascendental en la defensa frente a la enfermedad meningocócica, como lo corrobora el hecho de que se afecten fundamentalmente los niños, la presentación en ciclos epidémicos, la existencia de inmunidad permanente tras la curación y la agrupación geográfica de determinados tipos de anticuerpos antimeningocócicos. En los niños de corta edad, la incidencia de la enfermedad está relacionada con la desaparición de los anticuerpos maternos que existen hasta el cuarto mes de vida. Es casi imposible detectarlos desde esa edad hasta alrededor de los 8 meses, momento en que se elevan progresivamente⁴⁶.

2.1.5.5. Alteraciones específicas del sistema inmunitario

La enfermedad meningocócica se puede presentar con mayor frecuencia en individuos con enfermedades inmunológicas tales como el síndrome nefrótico, la hipogammaglobulinemia, esplenectomizados, o con VIH o SIDA^{43,46}.

Se ha encontrado con frecuencia creciente una asociación entre la enfermedad meningocócica y diversas deficiencias genéticas del complemento, generalmente de los componentes finales C5 a C8, pero recientemente también de los primeros componentes (C3-C4) lo que demostraba la existencia de trastornos análogos en familiares de los afectados. También se ha descrito una mayor afectación en familias con déficit de properdina, trastorno genético ligado al cromosoma Y, lo que ayudaría a explicar el patrón de predominio masculino^{1,4,43}.

Las personas con asplenia anatómica o funcional también presentan un riesgo mas elevado de padecer enfermedad meningocócica, al igual que los pacientes VIH positivos.

2.1.5.6. Factores geográficos y estacionales

La enfermedad meningocócica se presenta en ondas multianuales, con epidemias cada 10-12 años. En las zonas templadas del hemisferio norte, el año epidemiológico de la enfermedad meningocócica abarca de julio a junio; la mayoría de los casos se presentan en los meses de invierno y primavera, lo que se ve favorecido por factores como la mayor concentración de personas en locales cerrados, la baja humedad y el frío²⁰.

La enfermedad meningocócica a través de ondas epidémicas extensas ocasionadas por el meningococo A causa miles de muertes en el llamado cinturón de la meningitis del África subsahariana. Este cinturón se define entre las latitudes 4° y 16° norte. La predominancia geográfica de las epidemias y su mayor incidencia en estaciones secas así como el descenso de la misma con el comienzo de las lluvias

sugiere el posible papel que juegan los condicionantes medioambientales si bien los mecanismos se desconocen actualmente. Se ha postulado que el bajo nivel de humedad y el polvo del desierto pueden alterar la barrera mucosa y/o inhibir los mecanismos de defensa inmune lo cual favorece la invasión⁴⁷. Un reciente análisis de la distribución epidémica y ambiental de la enfermedad indica que los perfiles de humedad y el tipo de superficie terrestre marcan las áreas de alto y bajo riesgo de epidemia así como la alta densidad poblacional y el polvo del desierto presente en algunas regiones⁴⁸.

2.1.5.7. Factores ambientales

El ambiente en el que existe mayor riesgo de adquirir la infección meningocócica es el familiar, entre las personas que conviven en la misma casa y sobre todo entre las que duermen en la misma habitación. En estos casos se han observado tasas de ataque secundario de $2.2=2.8/1.000$, valores mil veces mayores que los observados en la población ($0,23/100.000$ habitantes). Las tasas de ataque secundario en epidemias son mucho más altas que las halladas en investigaciones de casos esporádicos⁴.

Durante mucho tiempo se atribuyó gran importancia al ambiente escolar como factor de riesgo, hasta el punto de adoptarse el cierre de centros tras la presentación de casos. En la actualidad, todos los expertos en la materia coinciden en señalar que el medio escolar no representa un mayor riesgo de adquirir la enfermedad meningocócica. Excepto viviendas, cuarteles, internados y guarderías infantiles, los restantes ambientes como hospitales, fábricas, etc, no representan un mayor riesgo de adquirir la enfermedad. Se ha descrito un mayor riesgo en los militares en épocas de movilización, favorecido por el hacinamiento en los barracones, el estrés y el cansancio. En general, puede afirmarse que el riesgo de contraer la enfermedad es incierto en las personas que no son convivientes domiciliarios, entendiéndose por tales los que duermen en la misma casa⁴.

2.1.5.8. Hacinamiento

Las condiciones de hacinamiento (medido por el volumen de aire por habitante en la casa), ligadas con el nivel socioeconómico, favorecen la presentación de la enfermedad. El hacinamiento es el factor mas claramente asociado con la prevalencia elevada de portadores⁴.

2.1.5.9. Infecciones respiratorias

Se ha observado una asociación de las infecciones por virus gripal, adenovirus, virus respiratorio sincitial y *Mycoplasma pneumoniae* con la enfermedad meningocócica. La interacción entre las infecciones respiratorias víricas y las bacterianas se debe a que las primeras lesionan los mecanismos de auto depuración bacteriana de la mucosa rinofaríngea, al destruir el epitelio ciliado, inhibir el poder fagocitario de los leucocitos y producir modificaciones fisicoquímicas de las secreciones respiratorias^{4,49-51}. Por otro lado, recientemente un estudio de casos y controles llevado a cabo por Dunlop y colaboradores⁵² concluye que el virus respiratorio sincitial no aumenta la susceptibilidad de desarrollar enfermedad meningocócica.

La colonización entérica por gérmenes de los géneros *Bacillus* y *Micrococcus*, que comparten antígenos de superficie con el meningococo, puede influir en la presentación epidémica de la enfermedad. Estos gérmenes debido a fenómenos de inmunidad cruzada, producen IgA sérica y secretora antimeningococo, que no solo no lisa, sino que bloquea el proceso lítico de la IgG y de la IgM. Ello se demostró al comprobar que, eliminando la IgA del suero de soldados susceptibles, se restablecía la actividad bactericida frente al meningococo. Por tanto, la presentación epidémica de la enfermedad meningocócica podría depender no solo de la transmisión aérea del meningococo sino también de la transmisión fecal=oral de estos gérmenes²⁰.

2.1.5.10. Mecanismos inherentes a la bacteria

La *Neisseria Meningitidis* normalmente actúa como bacteria comensal, exclusivamente en los humanos. Solamente una minoría de las bacterias aisladas a partir de muestras nasofaríngeas causa enfermedad invasiva posterior. El meningococo que conduce a una enfermedad invasiva posee una cápsula que le confiere protección frente a los mecanismos de defensa del huésped. Además, ciertas adhesinas (como los Pili), los factores que actúan sobre la adquisición de nutrientes y los mecanismos específicos para adquirir hierro de la lactoferrina, la transferrina y la hemoglobina del huésped dan potencia a la patogenicidad de la bacteria. Pero, el factor de virulencia más importante es la capacidad de liberar vesículas de la membrana externa que consisten en lipooligosacáridos (endotoxinas), proteínas de membrana externa, fosfolípidos y polisacáridos capsulares. El meningococo es capaz de llevar a cabo su propia autólisis liberando, así DNA y componentes de la pared bacteriana lo cual desencadena una potente respuesta inflamatoria en el huésped. Las razones por las que un determinado clon bacteriano

conlleva a una enfermedad invasiva no se conocen en profundidad. No obstante, se sabe que poseen características antigénicas que no son reconocidas por el huésped consiguiendo burlar los mecanismos de respuesta inmune adaptativa^{4,53}.

2.1.5.11. Polimorfismos genéticos

En los últimos años, se ha observado que algunos polimorfismos en genes que codifican ciertas proteínas de gran relevancia en la fisiopatología de la enfermedad como: el CD32 (Fcγ-receptor II), el CD16 (Fcγ-receptor III), la lectina de unión a manosa y el TLR4 están asociados a un aumento del riesgo de padecer enfermedad meningocócica así como una mayor severidad y un peor pronóstico^{4,43}.

A continuación se describen los polimorfismos encontrados hasta el momento según el papel que desempeñan en la fisiopatología de la enfermedad meningocócica.

2.1.5.11.1. Colonización e invasión

En la fase de colonización e invasión de la bacteria se han descrito algunos determinantes, por el momento no concluyentes, que parecen aumentar la susceptibilidad a la enfermedad meningocócica.

- a. Antígenos ABO¹³: La forma soluble de los antígenos del grupo sanguíneo es una característica del huésped controlada genéticamente. Aproximadamente el 15% de la población no tienen la capacidad de segregar dichos antígenos en la saliva lo cual puede determinar un aumento de la susceptibilidad de padecer la enfermedad. No obstante para validar dicha asociación son necesarios estudios con mayor número de pacientes.
- b. Exposición al humo de tabaco^{13,54,55}: Si bien la exposición al humo de tabaco se ha visto como factor de riesgo de colonización, hasta el momento, no se han establecido determinantes genéticos implicados en esta fase, a pesar de que este es el primer paso en la patogenia de la enfermedad, y se ha postulado la implicación de determinantes genéticos en la respuesta del huésped frente a la *Neisseria Meningitidis*.
- c. Moléculas de adhesión¹⁴: Interacciones entre las proteínas de adhesión del meningococo y las proteínas del epitelio nasofaríngeo del huésped, entre ellas el antígeno carcino embrionario determinan el estado de invasión de la bacteria. Callaghan y colaboradores postularon que la diversidad genética de estas proteínas pueden jugar un papel importante en la susceptibilidad de la EM.

2.1.5.11.2. Inmunidad innata

La respuesta innata es filogenéticamente más antigua que la adquirida. En ella intervienen un gran número de proteínas y receptores celulares que ayudan a reconocer los mecanismos invasores de la bacteria y así iniciar los mecanismos bactericidas y opsonofagocíticos.

- a) Receptores Toll-like: la respuesta innata se inicia tras la interacción entre los antígenos estructurales de la bacteria y los receptores del huésped (toll like receptors, TLRs). El lipopolisacárido es el componente de membrana más potente en la activación de la respuesta innata vía TLR4. La variación alélica en el TLR4 es rara y a pesar de no haber encontrado asociación genética entre ésta y la susceptibilidad de padecer la EM, ciertas mutaciones en dicha molécula sugieren un papel determinante del TLR4 en el riesgo de padecer la enfermedad⁵⁶⁻⁵⁸. En el último año, Faber y colaboradores encontraron una asociación entre el polimorfismo Asp299Gly del TLR4 y la susceptibilidad de sufrir EM⁵⁹ que no pudo ser confirmada en otros estudios⁶⁰ probablemente debido a las diferencias existentes en la población estudiada de ambos estudios. Por otro lado, una porina de la membrana externa del meningococo, la PorB, se une al TLR2 induciendo la activación celular; no obstante no se ha encontrado asociación genética entre los distintos polimorfismos de esta molécula y la susceptibilidad del huésped frente a la EM. En modelos animales, el TLR9 se ha relacionado con el pronóstico de la sepsis meningocócica grave⁶¹ si bien esta evidencia no ha podido ser comprobada en humanos.
- b) Complemento: En el sistema del complemento están implicadas tres vías que convergen en la formación de un complejo de ataque de membrana cuyo fin es la lisis y muerte de la bacteria. La primera vía es la clásica que se inicia con la unión del C1q a la superficie de la bacteria o de manera indirecta por los complejos anticuerpo-antígeno. La segunda vía, es la activada por la lectina de unión a la manosa (MBL), dicha vía es similar a la clásica. La tercera vía, llamada vía alternativa, es activada por la unión del C3 con el factor B y el factor D para generar C3b y actúa como amplificador de la activación de anticuerpos. Las tres vías convergen en la formación de la enzima C3 convertasa⁶².

- a. Déficit de algún componente del complemento: El déficit de algún componente tiene un efecto directo sobre la susceptibilidad y gravedad⁶³⁻⁶⁵. Los individuos con déficit de las porciones finales del complemento tienen un riesgo entre 7.000 y 10.000 mayor de sufrir infecciones meningocócicas. Sin embargo, de manera llamativa la mortalidad en estos pacientes es menor frente a la de la población general debido a que el pico de incidencia en los primeros se produce alrededor de los 17 años⁶⁴.
- b. Lectina de unión a manosa: la lectina de unión a manosa es una proteína que interviene en la respuesta inmune innata y mediante su unión a componentes de la pared bacteriana activa dos sistemas de proteasas. Defectos en esta proteína resultan en una alteración de la activación del complemento y un aumento de la susceptibilidad. Se han encontrado tres variantes alélicas en los codones 52, 54 y 57 del exón 1 asociadas a la susceptibilidad de la EM. Los individuos que poseen variantes funcionales en los genes que codifican estas proteínas tienen un descenso de la concentración en plasma de esta proteína y por tanto un aumento de la susceptibilidad de la EM, si bien parece no estar relacionado con el grado de severidad⁶⁶. En dos estudios llevados a cabo en dos cohortes de casos se observó una mayor prevalencia de las variantes homocigotas de la lectina de unión a la manosa frente a los controles⁶⁶.
- c. Reguladores de la activación del complemento. La activación exagerada del sistema del complemento puede tener un efecto deletéreo en la supervivencia del huésped ya que contribuye al daño tisular en el shock séptico. Dicha activación está regulada por proteínas inhibitoras y/o activadoras que juegan un papel determinante en la inmunidad innata frente a la bacteria⁶².
- d. Properdina: la properdina es un regulador de la vía alternativa del complemento que se une y da estabilidad a las enzimas convertasas C3/C5, C3bBb y C3bBbC3b. El déficit de esta proteína, ligado al cromosoma X, se ha

relacionado con una alta tasa de mortalidad en pacientes con meningococemia^{67,68} y, por otro lado, a un aumento de la susceptibilidad a las infecciones por serotipos atípicos de *N. Meningitidis*⁶⁹.

- e. Factor D: ciertos polimorfismos en esta proteína perteneciente a la vía alternativa del complemento han sido relacionados con un aumento de la susceptibilidad de la enfermedad. Si bien este dato debe ser contrastado con un mayor número de pacientes⁷⁰.
 - f. Factor H. El factor H es otra proteína que regula la activación del complemento a través de la vía alternativa. Recientemente se ha descrito el polimorfismo C496T el cual conlleva a un aumento de la concentración del factor H en plasma lo que se relaciona con un aumento de la susceptibilidad a sufrir EM⁷¹ ya que el meningococo utiliza el factor H para defenderse de la acción del complemento⁷².
- c) Proteínas surfactantes: las proteínas surfactantes (SP)-A y SP-D se expresan en la nasofaringe y el aparato respiratorio. Dichas proteínas se unen a azúcares microbianos y activan la respuesta inflamatoria⁶². Un SNP en el aminoácido 223 en la proteína SP-A alelo 1a1 se relacionó con un aumento del riesgo de sufrir EM⁷³. La estado homocigoto del alelo 1^a1 del SP-A2 se relacionó con un efecto protector. Por tanto, las variantes genéticas en estas proteínas están asociadas con las susceptibilidad y el pronóstico de la EM, no obstante estos resultados precisan ser contrastados⁶².

2.1.5.11.3. Inmunidad adquirida

Los leucocitos polimorfonucleares poseen tres clases de receptores para la IgG (FcγRI = CD64, FcγRIIa = CD32, FcγRIIb = CD16). FcγRIIa es el único capaz de unirse a IgG1, IgG2 e IgG3. Se han descrito dos formas alotípicas de este receptor (H131 y R131). Los homocigotos para H131 poseen una fagocitosis menos efectiva⁷⁴ una mayor susceptibilidad a la enfermedad⁷⁵ y mayor riesgo de complicaciones. En los pacientes con déficit del complemento, cuyo mecanismo de defensa depende de la capacidad de fagocitosis, se observó de manera significativa una mayor gravedad de la enfermedad. También, el alotipo FcγIIa-R/R131 se ha asociado con un aumento de la susceptibilidad entre los supervivientes de la púrpura fulminante⁷⁴ resultado que no ha podido confirmarse en posteriores trabajos⁷⁶.

2.1.5.11.4. Variaciones genéticas que regulan la cascada de la coagulación y la púrpura fulminante

Una de las características más importantes de la EM es la concurrencia de la púrpura y las alteraciones de la coagulación. Los trastornos de la coagulación ocurren en la mayoría de los pacientes afectos de la EM pero la púrpura fulminante es la complicación más devastadora de la enfermedad la cual conlleva en algunos casos a la gangrena y como consecuencia a la amputación de los dedos y la extremidad completa. Esta complicación puede ocurrir entre el 5-10% de los niños con EM y puede ser letal hasta en el 60% de los casos⁷⁷. En la última década, algunos estudios han reflejado que la fisiopatología de la coagulopatía de la EM representa un complejo desequilibrio entre las vías procoagulantes y anticoagulantes.

- a) Factor V Leiden: Es uno de los factores de riesgo más comúnmente relacionado con la trombosis y más concretamente con el tromboembolismo pulmonar. Este factor juega un papel importante en el desarrollo de la púrpura fulminante. Si bien los pacientes heterocigotos para la mutación hallada presentan mayor número de complicaciones tromboembólicas (injertos cutáneos, amputaciones...) no se ha demostrado un incremento de la mortalidad ni de la susceptibilidad⁷⁸.
- b) Activador del plasminógeno tisular (t-PA) e inhibidor del activador del plasminógeno (PAI). Ambas proteínas activan la fibrinólisis mediante la conversión del plasminógeno en su forma activa lo cual conlleva a la degradación de la fibrina. Un polimorfismo funcional en la región promotora del gen PAI-1 ha sido relacionado con una mayor severidad de la EM así como un peor pronóstico⁷⁹⁻⁸³.
- c) Proteína C y trombomodulina. Ambos son anticoagulantes naturales y mantienen el equilibrio entre coagulación y fibrinólisis. La proteína C activada y unida a su cofactor, la proteína S, inactiva a los factores procoagulantes V y VIII y al PAI-1 pero, también ejerce un efecto modulador sobre la respuesta inflamatoria, disminuyendo la producción de citoquinas y la adherencia de los leucocitos a la pared endotelial. La trombina, la trombomodulina y el receptor endotelial de la proteína C activan a la proteína C. La proteína C activada inhibe al PAI-1, inactiva al factor V y al VIII y ejerce un feedback negativo sobre la respuesta inflamatoria. Dos polimorfismos del gen de la proteína C en las posiciones 1654 (C>T) y 1641 (A>G) determinan la concentración

en plasma de la PC y en los pacientes afectos de EM los niveles bajos de PC se relacionan con un aumento de la severidad⁸⁴.

- d) Inhibidor de la fibrinólisis activada por la trombina (TAFI). Otro inhibidor de la fibrinólisis contiene tres SNPs en la región codificante del gen CPB2 una de las cuales conlleva a un aumento potencial de la actividad antifibrinolítica. Dicho polimorfismo se relaciona con el pronóstico de la EM. En un pequeño estudio se observó que los niveles del TAFI activado se correlacionan con la severidad de la enfermedad y por otro lado, la frecuencia del Thr325Thr fue significativamente mayor en los pacientes con coagulación intravascular diseminada⁶².

2.1.5.11.5. Variaciones genéticas de las citoquinas

Un extenso cuerpo de evidencia sugiere que los pacientes con púrpura fulminante presentan una respuesta inflamatoria exagerada y desmesurada. La producción de citoquinas está regulada no sólo por los genes que las codifican sino también por la activación de los CD14, los receptores-toll de la endotoxina y otros activadores y señales intracelulares que conllevan a la liberación de factores de transcripción.

- a) TNF α : Esta citoquina se libera tras la estimulación del LPS en los pacientes afectos de EM. Aproximadamente el 60% de la variación en la producción del TNF viene determinada genéticamente y los niveles se co-relacionan con la severidad de la enfermedad⁸⁵⁻⁸⁷. Un polimorfismo en la región promotora del gen del TNF está asociado a un aumento de la severidad y el peor pronóstico de la enfermedad^{86,87}.
- b) IL-1: Existen al menos dos genotipos que determinan la producción de esta citoquina. Se ha observado que los individuos homocigotos en la posición -511 del IL1B tendrán mayor probabilidad de morir durante la enfermedad⁸⁸. Del mismo modo, la frecuencia alélica de IL-1raA2 es mayor en los pacientes afectos que en los sanos, lo cual podría influir en la susceptibilidad frente a la enfermedad^{88,89}.
- c) IL-6: Un polimorfismo en la región promotora del gen que la codifica determina las altas concentraciones a la que se encuentra durante el proceso y, multiplica por tres el riesgo de morir en pacientes con shock séptico⁹⁰.
- d) IL-10: Su principal efecto antiinflamatorio lo consigue a través de la inhibición del TNF α . Se han observado diferentes niveles de IL-10 entre

los supervivientes y los fallecidos a causa de la enfermedad meningocócica⁹¹.

2.1.5.11.6. Lipopolisacárido

Una vez que el LPS se une a su proteína (LBP) es reconocido por el receptor del LPS (CD14) y se inicia una serie de vías que tienen como objetivo la replicación de genes para la producción de mediadores pro-inflamatorios en el núcleo de la célula. Teóricamente, polimorfismos en el gen de la LBP podrían modificar la respuesta del huésped frente al LPS. Se ha observado que el polimorfismo Cys98→Gly se encuentra en mayor proporción en hombres que en mujeres con sepsis, lo cual se asocia a un peor pronóstico de los primeros⁹². Del mismo modo, existen evidencias de que mutaciones en los genes *tlr2* y *tlr4* están asociadas a una hiporrespuesta frente al LPS. Asimismo, la presencia de repeticiones raras de aminoácidos en el TLR4 ha mostrado efectos deletéreos en humanos, hallándose en mayor número en los afectos de sepsis meningocócica⁵⁷. La proteína estimulante de la acción bactericida y permeabilizante (BPI) almacenada en gránulos en los neutrófilos ha sido estudiada como posible fármaco adyuvante en el sepsis meningocócica grave⁹³. La enzima convertidora de angiotensina (ACE) está asociada con la respuesta proinflamatoria. La ausencia de 284 pares de bases como marcador en el gen de la ACE (alelo D) está asociado con una mayor actividad de la enzima. Por tanto, el genotipo DD presentará una mayor actividad tisular y mayor riesgo de tromboembolismo venoso⁹⁴, en definitiva mayor gravedad. Sin embargo, no se ha observado incremento de la mortalidad hasta el momento.

2.1.5.11.7. Transmisión y estado de portador como factor de riesgo

La adquisición del meningococo a través de las secreciones respiratorias puede conllevar a dos situaciones: 1. Estado de portador y 2. Enfermedad invasiva. La concentración de bacterias necesaria para transmitirse la enfermedad se desconoce⁴³.

El contacto del meningococo con la mucosa rinofaríngea, premisa fundamental para la infección meningocócica, da lugar en algunas ocasiones, las menos, a la enfermedad y, las más, a la producción de anticuerpos locales en un primer momento y humorales más tarde, detectables unas semanas después de haberse iniciado la colonización, que se mantienen elevados como mínimo 4-6 meses después de dejar de ser portadores. Al parecer, también la colonización de especies de *Neisseria* no patógenas, como la *N. lactámica*, estimula la formación de anticuerpos protectores frente a *N. meningitidis*.

Las tasas de portador más altas se han observado entre los grupos militares (36-71%). La duración del estado de portador puede ser de días a meses con tendencia a ser más larga en los meses de otoño e invierno. La tasa de colonización puede verse afectada por la técnica de recogida de muestra empleada, por el momento estacional de la región y el estado de vacunación o las intervenciones quimioprolácticas realizadas sobre la población. Se han descrito tres tipos de portadores: transitorios, en los que el estado de portador es muy corto (días, semanas); crónicos, cuando este estado se mantiene durante largos períodos de tiempo, de hasta 2 o más años, e intermitentes, cuando presentan colonizaciones repetidas durante cortos períodos de tiempo. Algunas cepas de meningococo son altamente transmisibles, en general las del serogrupo C, por lo que rara vez producen un estado de portador. El estado de portador se ha relacionado con los antígenos del grupo ABO y el grupo poblacional del que proceden. La edad es uno de los factores que más influyen en el estado de portador. En Europa y Norte América, las tasas de portador son muy bajas en el primer año de vida y posteriormente ascienden rápidamente hasta la adolescencia hasta alcanzar su máximo entre los 20-24 años⁹⁵.

Otros factores que aumentan el riesgo de portador son: el sexo masculino, las infecciones respiratorias concomitantes, el estado de fumador y el bajo nivel socioeconómico. El tabaquismo, tanto activo como pasivo, se ha asociado con la enfermedad meningocócica, al observar que la prevalencia de portadores es más elevada entre fumadores y las personas que conviven con ellos. Ahora bien, se desconoce la razón por la que en unas personas el estado de portador ocasiona protección y en otras provoca la enfermedad. Se piensa que en estas últimas existen defectos inmunitarios, específicos o inespecíficos, o de integridad de la mucosa rinofaríngea. También depende en grado muy importante de la virulencia del germen.

Se ha comprobado que las infecciones recientes tienen mayor riesgo de desembocar en una enfermedad meningocócica y que los primeros momentos del estado de portador (tiempo que media entre la colonización y la producción de anticuerpos locales) son los que entrañan mayor peligro. Se considera que transcurridos 7-10 días, tiempo que se estima necesario para la producción de anticuerpos, el estado de portador implica ya un sistema defensivo, que excluye la eventual enfermedad. El riesgo, por tanto, no se encuentra en el estado de portador sino en el hecho de no disponer de defensas específicas frente al meningococo. La

determinación rutinaria de anticuerpos para conocer si un individuo es o no susceptible de enfermar no es, hoy por hoy, técnicamente realizable.

2.1.6. Fisiopatología e historia natural de la enfermedad

Los humanos constituyen el único y obligado reservorio natural del meningococo. La capacidad de colonizar y causar bacteriemia se debe a la habilidad que éste tiene de evadir el sistema inmune del huésped⁹⁶. La inmunidad innata y también, la adquirida juegan un papel importante en la defensa contra el microorganismo (ver Figura 5).

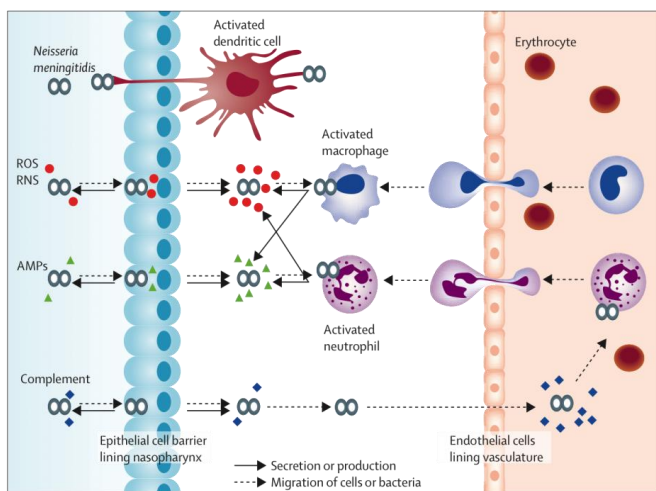


Figura 5. Mecanismos innatos de defensa del huésped frente al meningococo. En la nasofaringe las células epiteliales conforman la barrera de defensa y producen sustancias antimicrobianas (factores del complemento, péptidos antimicrobianos y moléculas oxigenadas). Adaptado de LO y cols⁹⁶.

Desde la nasofaringe las bacterias se transmiten en forma de aerosol o secreciones. Mediante los Pili se unen al cofactor CD46, una proteína de membrana. Sucesivamente mediante las proteínas opsonizadoras Opa y Opc de su membrana se unirán al CD66 (antígeno carcinoembrionario) y a los receptores heparán-sulfato-glicanos. Posteriormente, las bacterias son fagocitadas por la célula. La supervivencia del meningococo en el interior de la vacuola fagocítica depende de la proteasa IgA1 y la porB, proteínas de la membrana externa de la bacteria.

Una vez que el meningococo penetra la barrera mucosa de las vías respiratorias altas y contacta con las células epiteliales se produce un conjunto de complejas interacciones que conllevan a la destrucción de la superficie epitelial y a la formación de microcolonias. El meningococo puede entonces ser fagocitado por las células epiteliales (no ciliadas), escapar o incluso alcanzar la submucosa o directamente invadir otras superficies epiteliales lesionadas pudiendo ocurrir la enfermedad entre el día 1 y el 14 después de la adquisición^{26,43}.

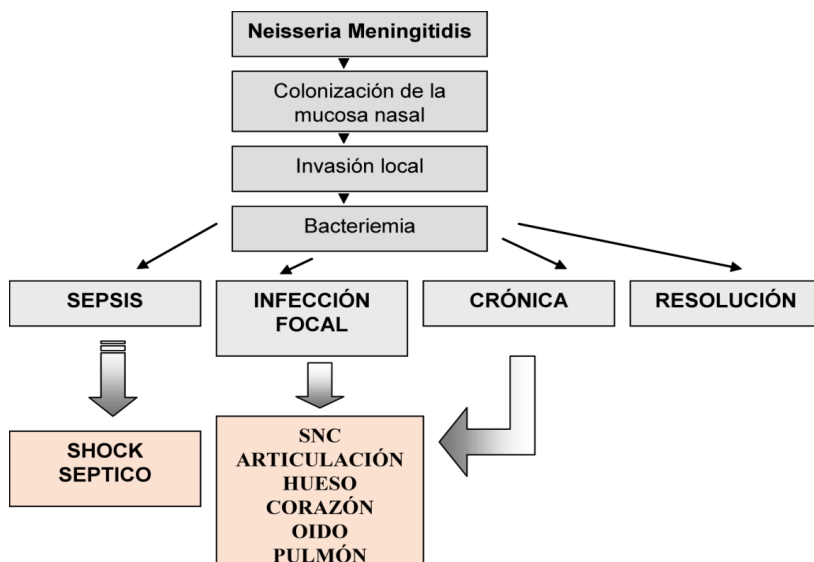


Figura 6. Formas de presentación de la enfermedad meningocócica tras la colonización.

El lipopolisacárido es la molécula con mayor poder de activación del sistema del complemento. Se encuentra a altas concentraciones en el plasma del paciente afecto de shock séptico y en el LCR de pacientes con meningitis meningocócica. Los lipopolisacáridos son reconocidos por tres componentes de las células de la inmunidad innata: CD14, TLR4 y la proteína de diferenciación mieloide tipo 2 (MD2). Cuando el lípido A, la porción tóxica del LPS, es transferido desde la proteína de unión al LPS al CD14 y de ahí al MD2 y al TLR4 se genera una señal transmembrana que pone en marcha otras vías de señalización intracelular con conducen a la activación del factor nuclear κ B (NF κ B) y otras citoquinas. El NF κ B migra al núcleo de la célula e inicia la transcripción de genes que codifican para mediadores de la

respuesta inflamatoria (Figura 3). La habilidad que posee la bacteria de burlar los mecanismos de defensa del huésped se basa en la capacidad de expresión de un genoma altamente dinámico, es decir, con capacidad de modificarse. El meningococo tiene casi un 50% menos de genes que la común *E. Coli* pero posee la capacidad de adquirir material genético de otra bacteria y transformarse. Su genoma contiene secuencias repetitivas y móviles que dan como resultado la aparición de nuevas variantes con características antigénicas diferentes lo cual hace muy difícil el desarrollo de vacunas eficaces. Otro mecanismo que utiliza el germen es la expresión de antígenos similares a los del huésped lo cual no puede ser incorporado a las vacuna. Esta es una particularidad sobre todo el serogrupo B, cuyo polisacárido capsular tiene mimetismo molecular con los sialicos neuronales, etc⁹⁶.

Una vez que el meningococo atraviesa la barrera mucosa de la nasofaringe pasa al torrente circulatorio (bacteriemia) y conducirá a las distintas formas de presentación clínica (Figura 6).

2.1.6.1. El papel del lipopolisacárido

Los meningococos liberan grandes cantidades de endotoxinas, fragmentos de la pared externa de la cápsula, es decir lipopolisacáridos. Los niveles altos de endotoxinas se correlacionan con un peor pronóstico y severidad de la enfermedad sistémica. Del mismo modo, bajo niveles de anticuerpos e inmadurez de las células T juegan un papel en el desarrollo de la enfermedad en los niños pequeños. El nivel de anticuerpos bactericidas viene determinado por el estado de portador o la colonización de bacterias no patógenas como *Neisseira lactámica*¹.

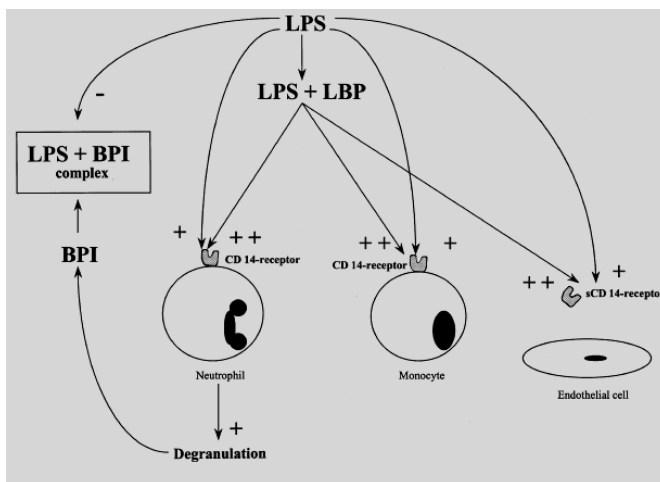


Figura 7. Adaptado de Kleijn ED y cols¹. LPS: Lipopolisacárido. LBP: proteína de unión al LPS. BPI: proteína bactericida permeabilizante

Los factores del complemento, anticuerpos, albúmina, transferrina y proteínas de unión al LPS forman complejos con el LPS. Muchas de estas proteínas tienen un efecto detoxificante, si bien, la proteína de unión al LPS intensifica el efecto del mismo. Una vez establecida la unión entre estas dos moléculas, el LPS se une al receptor CD14 de los macrófagos y polimorfonucleares. Estas células sintetizan la proteína bactericida-permeabilizante que tiene gran afinidad por el LPS neutralizando su acción.

2.1.6.2. Mediadores inflamatorios

El LPS induce la liberación de mediadores pro-inflamatorios en la sepsis por Gram-negativos¹ (Figura 7). Estos mediadores son sintetizados por los macrófagos, monocitos y células endoteliales. Las citoquinas son agentes paracrinos que actúan localmente según las señales que reciben de las células adyacentes. Datos experimentales y clínicos han mostrado que el TNF- α y IL-1 β son los principales mediadores en la sepsis meningocócica. Estas moléculas actúan mediante diferentes mecanismos incluyendo la producción de otras citoquinas (IL-6, IL-8, factor inhibidor de leucemia, IL-12 y IFN- α), activación de neutrófilos y leucocitos y aumento de la adherencia de los polimorfonucleares y monocitos al endotelio, síntesis de prostaglandinas y liberación de óxido nítrico⁹⁷.

La IL-6 es el mayor pirógeno endógeno y estimula la síntesis de proteínas de fase aguda y por otro lado, a los linfocitos B induciendo la producción de anticuerpos. La IL-8 es un potente factor quimiotáctico el cual estimula a los neutrófilos y probablemente juega un papel importante en la lesión endotelial mediada por los mismos. El factor inhibidor leucémico (LIF) tiene múltiples acciones, muchas de ellas las comparte con el TNF- α , IL-1 y IL-6. La IL-12 parece jugar un papel importante en la diferenciación de los linfocitos Th1 e induce la producción de INF- γ por los linfocitos T y las “natural killer”. Los niveles de IL-12 en la sepsis meningocócica se correlacionan con el pronóstico y la severidad de la enfermedad⁹⁸.

Tras el pico de liberación de citoquinas se produce un aumento de citoquinas contrarreguladoras como el antagonista del receptor IL-1 (IL-1Ra), IL-10, receptores solubles del TNF (sTNFRs) y de la IL6 (sIL-6R). Estos mediadores excepto el sIL-6R tienen un efecto anti-inflamatorio puesto que reducen la mortalidad en modelos experimentales. El IL-1Ra inhibe la acción pro-inflamatoria de la IL-1 mediante la unión competitiva al receptor de la IL-1. El papel de sTNFR es complejo. Tras la unión del TNF- α a la célula diana se libera sTNFR y ello podría proteger a la célula de la activación del TNF- α , mientras la sIL-6R podría favorecer el efecto de la IL-6. Por otro lado, la IL-10 es un potente supresor de la actividad procoagulante del LPS sobre los monocitos. Los niveles de IL-10 en la fase inicial del shock séptico meningocócico están relacionados con su pronóstico en los niños. La liberación de dicha citoquina estimula la producción de IL-1Ra e induce la síntesis de sTNFRs¹.

Generalmente, los niveles de las citoquinas pro-inflamatorias se encuentran elevados al inicio de la enfermedad y su concentración se relaciona con la severidad y pronóstico de la enfermedad. Algunos estudios han mostrado la asociación entre una variación polimórfica en la región promotora del gen TNF- α y el riesgo de muerte por enfermedad meningocócica⁸⁶.

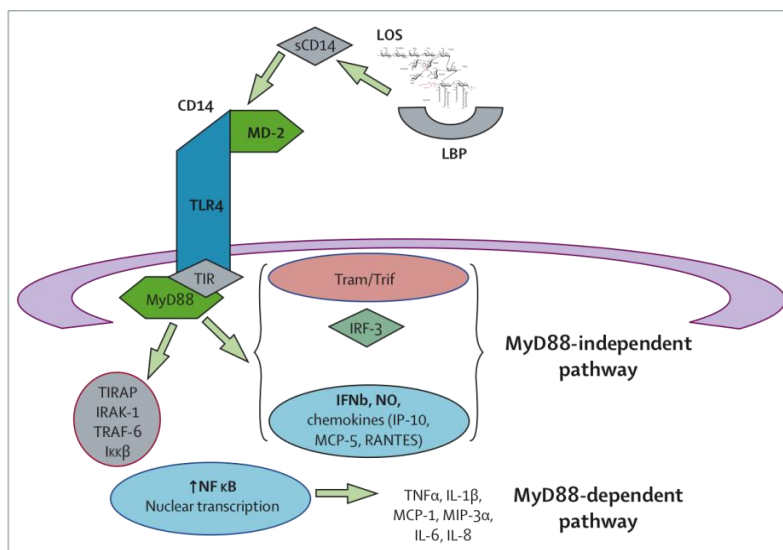


Figura 8. Cascada de activación de citoquinas mediada por el LPS. Adaptado de Stephens y cols⁴³.

2.1.6.3. Lesión endotelial y fuga capilar

Durante la sepsis, las endotoxinas y otros mediadores activan a la célula endotelial la cual sufre un cambio en su estructura y función. Se produce una destrucción del componente glicosaminoglicano responsable de la unión entre las células endoteliales con la consiguiente fuga capilar y edema. Este proceso está inducido por la acción del TNF- α , IL-1, IL-8, factor activador de plaquetas, leucotrienos, tromboxano A, trombina, factor de permeabilidad capilar, factores del complemento, kininas y factores de adherencia de neutrófilos y plaquetas^{97,99}. Los leucocitos activados son los primeros en iniciar el proceso de fagocitosis bacteriana y degranulación celular comenzando la tormenta de enzimas proteolíticas y radicales libres. La elastasa es uno de los productos liberados en la degranulación del neutrófilo activado. Ésta forma un complejo con la α_1 -antitripsina. Se han encontrado altas concentraciones de este complejo en los no supervivientes de la enfermedad¹.

2.1.6.4. El complemento

El sistema del complemento juega un papel esencial en la defensa del huésped. Dicho sistema activa el proceso de fagocitosis de los monocitos o neutrófilos, neutraliza la acción de las endotoxinas conduciendo a la lisis de la bacteria. El complemento mantiene la homeostasis, no sólo de la función inmune, sino también del sistema de coagulación, fibrinolisis, permeabilidad y tono vascular. La sepsis meningocócica fulminante está asociada a una activación excesiva del complemento. Las proteínas del complemento tienen efectos como la estimulación, agregación y degranulación de neutrófilos y favorece la expresión de selectinas de la superficie endotelial. No obstante, la sobre-estimulación o inhibición inadecuada del sistema del complemento conlleva a un daño tisular en ocasiones irreversible.

El complemento puede ser activado por dos vías: vía clásica y vía alternativa. Mediante la vía clásica los anticuerpos del huésped se unen a antígenos bacterianos. La vía alternativa es accionada por LPS, endotoxinas bacterianas, citoquinas e inmunocomplejos. La eliminación de la bacteria es mediada principalmente por la acción de la fracción C3b del complemento (acción fagocítica) y el complejo de ataque a la membrana C5b-C9 (lisis). En el shock meningocócico los niveles elevados de C3, C4, C5 y del complejo final así como las bajas concentraciones de precalicreína están relacionados con el pronóstico de la enfermedad¹⁰⁰. La activación del complemento en la EM puede persistir durante las primeras 12-24 h de la enfermedad, mientras el resto de los mediadores inflamatorios comienzan a disminuir. El déficit de complemento en algunos individuos destaca la importancia del mismo en la EM. El 80% de las infecciones bacterianas en estos pacientes estará causado por el meningococo, si bien, se ha observado que la mortalidad de los individuos con déficit de las últimas fracciones del complemento es entre un 5-10% más baja¹⁰¹.

El mayor inhibidor plasmático del complemento que se ha observado es el C1-inhibidor. La activación exagerada del complemento en pacientes con shock séptico se ha asociado a un peor pronóstico. Los niveles del C1 inhibidor tienden a ser normales en pacientes sépticos. No obstante dichos niveles deberían estar aumentados en la sepsis por lo que se deduce que existe un déficit relativo en los pacientes sépticos. En la última década se han publicado los resultados preliminares de la administración de dosis altas de C1-inhibidor en estos pacientes. Según los autores, el C1-inhibidor se puede administrar de manera segura en pacientes con shock séptico o con síndrome de fuga capilar jugando un papel importante en la atenuación del complemento¹⁰².

2.1.6.5. Coagulación y fibrinólisis

Los trastornos de la coagulación y fibrinólisis son comunes en pacientes con EM. La manifestación más grave es la coagulación intravascular diseminada (CID) caracterizada por microtrombosis y diátesis hemorrágica. La diseminación de la trombosis microvascular contribuye a la disfunción multiorgánica. La producción de trombina y la conversión de fibrinógeno en fibrina puede activar la vía intrínseca (factor XII) y la extrínseca (VII/factor tisular). La activación de la coagulación en la sepsis ocurre predominantemente a través de la vía extrínseca. Las endotoxinas y el TNF- α inducen la expresión del factor tisular lo cual activa a su vez al factor VII¹⁰³.

2.1.6.6. Disfunción circulatoria

El colapso circulatorio y el shock en los pacientes con sepsis meningocócica están desencadenados por la combinación de la alteración del tono vascular, la disfunción miocárdica, la fuga capilar y los fenómenos de microtrombosis intravascular. Inicialmente, estos pacientes presentan una intensa vasoconstricción mientras que en las fases siguientes de la enfermedad, caen las resistencias vasculares debido a la vasodilatación. El desequilibrio entre los fenómenos de vasodilatación y vasoconstricción desemboca en una vasodilatación generalizada e hipotensión excepto en ciertos territorios como la piel y la circulación pulmonar en los que se produce vasoconstricción¹. Los pacientes afectados presentaran cifras elevadas de catecolaminas, renina, aldosterona, tromboxano A2 y endotelina. Un déficit en la producción de PGI2 conduce a un predominio de los fenómenos de vasoconstricción¹.

El mecanismo principal de muerte en los pacientes con sepsis meningocócica es el colapso circulatorio desencadenado por la fuga capilar, la depleción del volumen intravascular, el fallo miocárdico y la vasodilatación. Cuando los mecanismos compensadores fallan, la hipotensión resultante compromete la perfusión de los órganos vitales resultando en hipoxia y acidosis lo cual contribuye aún más a la disfunción miocárdica. El tiempo en que se produce el colapso circulatorio varía con respecto a otras enfermedades infecciosas y también dependiendo de la edad del paciente. De este modo, el riesgo mayor de mortalidad en adultos se prolonga una semana, mientras que en niños es de 1 a 3 días¹.

El mecanismo por el que se desencadena el fallo miocárdico en niños permanece en parte desconocido. No solamente la hipoperfusión sino también, algunas citoquinas circulantes como el TNF alfa, IL-1 y la endotoxina por sí mismas podrían ser responsables del fracaso miocárdico¹⁰⁴. No obstante, otros aspectos de la

respuesta inflamatoria sistémica incluyendo citoquinas circulantes, daño tisular, interacción leucocito-endotelio podrían conducir a un edema miocárdico, hipoxia tisular por aumento de la demanda y en consecuencia un fallo circulatorio¹.

2.1.7. Manifestaciones clínicas

Uno de los pilares en el diagnóstico de la enfermedad meningocócica es su forma de presentación puesto que en ocasiones es difícil de distinguir de otras enfermedades más comunes y menos graves²⁴. La enfermedad meningocócica suele iniciarse de manera súbita con cefalea, fiebre, rigidez de cuello y, en ocasiones, náuseas, vómitos, fotofobia y alteración del nivel de consciencia¹⁹. En los lactantes, la infección meningocócica puede tener un inicio más larvado, con signos inespecíficos y sin rigidez de nuca aunque sí fontanela prominente. La sepsis meningocócica, o meningococemia, está caracterizada por un inicio súbito de fiebre y exantema petequial que rápidamente puede progresar hacia una púrpura fulminante a menudo asociada a hipotensión, hemorragia suprarrenal aguda y síndrome de disfunción multiorgánica⁴.

La neumonía meningocócica ocurre entre el 5 y el 15% de los pacientes con enfermedad meningocócica invasiva. Su diagnóstico es difícil puesto que el aislamiento de la bacteria en el esputo no haría posible distinguir entre los portadores y los que padecen la infección.

Mucho menos frecuente, otros cuadros asociados al síndrome meningocócico incluyen conjuntivitis¹⁰⁵, otitis media, epiglotitis, artritis¹⁰⁶, uretritis y pericarditis⁴.

En raras ocasiones, los pacientes pueden sufrir meningococemia crónica caracterizada por fiebre prolongada intermitente, exantema, artralgias y cefalea⁴.



Figura 9. Manifestaciones clínicas de la enfermedad meningocócica. Obsérvense las lesiones purpúricas (no desaparecen a la vitropresión), vasculopatía distal (necrosis de pulpejos), hemorragias subconjuntivales y aspecto de las glándulas suprarrenales. Adaptado de Rosentein y cols⁴.

2.1.8. Diagnóstico

El diagnóstico definitivo de la enfermedad meningocócica se establece mediante el aislamiento de la bacteria en cultivo. No obstante la sensibilidad del

cultivo puede ser baja, especialmente cuando se realiza tras el inicio de la antibioterapia. La tinción mediante gram de una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) continúa siendo un método útil en la identificación rápida de la bacteria. Algunos, otros métodos como la detección de antígeno polisacárido en el LCR mediante técnicas de aglutinación puede aumentar la sensibilidad del diagnóstico microbiológico. Estos métodos son rápidos y específicos y, pueden proporcionar la entidad del serogrupo infectante. No obstante, tienen un porcentaje de falsos negativos no despreciable, especialmente en los casos producidos por el serogrupo B. El test de antígenos en orina o en el suero no son fiables en el diagnóstico de la enfermedad. La serología mediante ELISA podría ser útil como parte de la búsqueda de infección meningocócica pero no para establecer el diagnóstico definitivo. El análisis mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ofrece ventajas en la detección de DNA bacteriano y no requiere organismos vivos para el diagnóstico. Por tanto, representa la herramienta más útil y rápida en el diagnóstico de la infección meningocócica. En suma, nuevos métodos basados en técnicas de subtipaje molecular pueden ayudar a la caracterización del meningococo a partir de los derivados de la PCR⁴ (Ver tabla 4).

TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS
Cultivo de sangre y/o LCR y/o raspado de petequias
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en sangre o LCR
Tinción de GRAM de muestra de sangre y/o LCR
Técnicas de detección de antígenos (aglutinación) en sangre, LCR y orina
Serología mediante ELISA

Tabla 4. Técnicas diagnósticas empleadas ante la sospecha de enfermedad meningocócica

2.1.9. Intervenciones terapéuticas

2.1.9.1. Objetivo del tratamiento

El pronóstico de un paciente con enfermedad meningocócica va a depender principalmente de su edad, de la forma de presentación clínica, las características

clonales de la bacteria y el manejo del cuadro ¹⁰⁷. En función de las evidencias existentes, los aspectos más importantes del manejo de la enfermedad meningocócica son: 1. Reconocimiento precoz de la enfermedad, 2. Derivación a un centro hospitalario-terciario, 3. Inicio precoz del tratamiento antibiótico, 4. Monitorización del paciente de manera estrecha y 5. Evaluación pronóstica periódica ^{4,108,109}.

Se describen a continuación los principales tratamientos empleados en el manejo de la enfermedad meningocócica, las evidencias que sustentan su utilidad y sus indicaciones vigentes, clasificados en función del mecanismo de acción (ver Tabla 5).

2.1.9.2. Antibióticos

Los antibióticos representan la piedra angular en el tratamiento de la infección meningocócica⁹⁹. Tan pronto como se sospecha una infección meningocócica, sin tener el diagnóstico microbiológico, se debe iniciar el tratamiento antibiótico empírico en base a los datos epidemiológicos que poseemos¹⁰⁸. El objetivo fundamental del tratamiento antibiótico en la meningitis meningocócica es alcanzar rápidamente el efecto bactericida en el LCR con el fin de yugular la proliferación de la enfermedad y evitar secuelas (p.e. abscesos cerebrales)²⁴.

Desde la introducción de los antibióticos la mortalidad por enfermedad meningocócica ha descendido desde casi el 100% hasta el 40% ²⁵. Inicialmente, a partir de los años 30, se emplearon las sulfonamidas, las cuales fueron sustituidas por la penicilina a mediados del siglo XX debido al aumento de resistencias. Desde los años 80, la susceptibilidad a la penicilina ha descendido en varios países de Europa, Canadá, Sudáfrica, Malawi, EEUU debido al tipo de bacteria, el área geográfica y a los mecanismos moleculares implicados. En los pacientes infectados con cepas resistentes a la penicilina está recomendado el uso de cefalosporinas.

El inicio de la antibioterapia debe ser lo más precoz posible^{99,110}. La hipótesis de que el uso precoz de antibióticos en la infección meningocócica agrava la situación clínica causando la liberación de endotoxina no ha sido probada hasta el momento¹¹¹⁻¹¹⁴. Sin embargo, posponer la administración de los mismos resulta en un aumento de la concentración bacteriana y en consecuencia una respuesta inflamatoria mayor^{107,115-117}.

Debido a la alta prevalencia de *S. Pneumoniae*, en niños mayores de 1 año se debería iniciar tratamiento empírico con vancomicina y cefotaxima o ceftriaxona^{4,118}. No obstante, en los niños menores de 1 año se valorará añadir vancomicina a la

terapia inicial con cefalosporina de 3ª generación (cefotaxima o ceftriaxona) y ampicilina⁴. Puesto que en situación epidémica el tratamiento de un gran número de pacientes con múltiples inyecciones de penicilina o incluso ceftriaxona podría llegar a ser impracticable, una dosis única de la solución oleosa de cloranfenicol ha demostrado ser tan efectiva como el tratamiento con penicilina sola durante 5 días

En este punto también resulta interesante conocer el grado de resistencia antibiótica que sufre nuestra región, así como la forma de predecir el fracaso terapéutico. En este sentido se creó el proyecto EU.MenNet para el estudio de la resistencia antibiótica del meningococo en Europa, incluyendo las características de la bacteria, zonas geográficas y las características moleculares de los mecanismos implicados, particularmente en la resistencia a la penicilina (Figura 10).

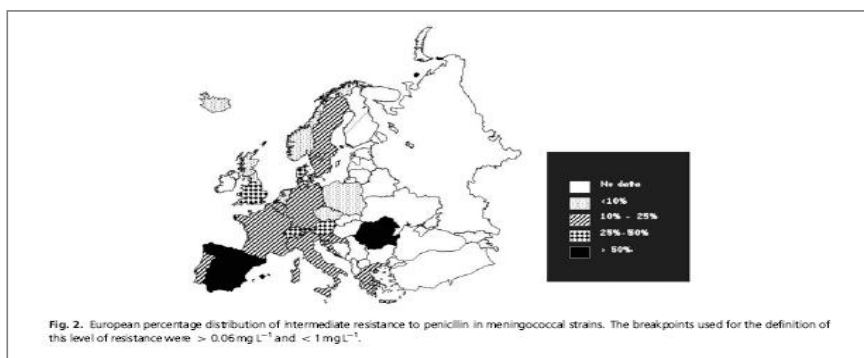


Figura 10. Grados de resistencia de la *Neisseria meningitidis* a la Penicilina en Europa. Los puntos de corte escogidos para definir el nivel de resistencia fueron $> 0.06 \text{ mg L}^{-1}$ y $< 1 \text{ mg L}^{-1}$. Adaptado de Vázquez y cols¹²⁰.

En general, a partir de las evidencias encontradas sobre los beneficios del uso de antibióticos parece convincente su administración precoz tan pronto se sospeche la enfermedad, incluso antes del ingreso hospitalario^{99,107,115-117}. En la tabla 5 se recogen los estudios más relevantes llevados a cabo sobre el uso precoz de antibioterapia en pacientes con sospecha de enfermedad meningocócica.

Estudio	Nivel de evidencia	Recomendación
Hahné et al (2006)	1- La administración precoz de antibioterapia ha demostrado un descenso de la mortalidad	B Previo al traslado del paciente a un centro hospitalario de tercer nivel debe administrarse antibioterapia de manera precoz
Hamish et al (2006)	2+ Los pacientes a los que se administró antibióticos antes de llegar al hospital estaban más graves que los no tratados	C Los efectos adversos de la penicilina en la primera hora de tratamiento, de causa no aclarada, deben ser tenidos en cuenta
Harnden et al (2006)	2+ Los pacientes a los que se administró antibióticos antes de llegar al hospital estaban más graves que los no tratados	C Los efectos adversos de la penicilina en la primera hora de tratamiento, de causa no aclarada, deben ser tenidos en cuenta
Wang et al (2000)	3 La administración de antibióticos a nivel pre-hospitalario se relaciona con un descenso de las complicaciones de la enfermedad	D El tratamiento antibiótico empírico debería ser considerado ante la sospecha de enfermedad meningocócica
Strang et al (1992)	3 La administración de penicilina iv contribuye al descenso de la mortalidad por EM	D Los médicos de atención primaria debería ser informados del beneficio del uso precoz de penicilina iv ante la sospecha de EM

Tabla 5. Estudios llevados a cabo sobre el uso precoz de antibióticos ante la sospecha de enfermedad meningocócica.

2.1.9.3. Tratamiento del shock séptico meningocócico

2.1.9.3.1. Oxigenoterapia

Se recomienda la administración de oxigenoterapia al 100% con el fin de restablecer el desequilibrio entre las demandas y la extracción tisular observado en el shock séptico. En shock séptico severo o en cuadros acompañados de insuficiencia respiratoria se realizará intubación endotraqueal y ventilación mecánica ¹²¹.

2.1.9.3.2. Acceso vascular

Garantizar un acceso vascular -idóneamente la canalización de una vía venosa central y, ante la imposibilidad de un acceso venoso mediante una vía intraósea- es una prioridad en el paciente crítico con los objetivos de: 1. Realizar una expansión vascular rápida, 2. Monitorizar la saturación de oxígeno venosa central (ScvO₂) y 3. Administrar soporte vasoactivo ^{121,122}.

2.1.9.3.3. Fluidoterapia

El objetivo principal del soporte vascular es mantener una adecuada oxigenación y perfusión tisular. Para ello resulta prioritario restaurar el volumen intravascular ¹²³.

La resucitación precoz con líquidos se ha visto asociada a un aumento de la supervivencia en niños con shock séptico ¹²². Los objetivos serán mantener una presión venosa central entre 8-12 mmHg y una ScvO₂>70%¹²⁴. Inicialmente se deben administrar bolos de 20 ml/kg. En la sepsis meningocócica fulminante generalmente se pueden emplear 60 ml/kg en la primera hora y hasta 120 ml/kg en las siguientes 4-6 horas, siendo necesario a veces 200 ml/kg en las primeras 24 horas ^{122,125}. La presencia de meningitis concomitante no justifica la limitación de la fluidoterapia, si bien se tendrá en cuenta la posibilidad de edema cerebral y empeoramiento de la situación respiratoria, exigiendo una monitorización estrecha ^{125,126}.

El líquido de elección será el suero fisiológico 0.9% ¹²⁵. No obstante, se han empleado coloides (albúmina 4-5%) con limitación por el riesgo de conducir a una fuga capilar y edema intersticial y, con ello, empeoramiento de la situación respiratoria^{127,128}. Los almidones (Elohes®, Voluven®) podrían tener un efecto negativo sobre la coagulación y la función renal ¹²⁹. Los hemoderivados (plasma fresco congelado, concentrado de hematías) se utilizarán en situaciones concretas (coagulopatía severa, anemización aguda con inestabilidad hemodinámica). En la actualidad no existe recomendación para el uso de las soluciones salinas hipertónicas en los niños ¹²¹.

Recomendación: Inicialmente se deben administrar bolos de 20 ml/kg de suero salino fisiológico 0.9% teniendo como objetivos mantener la PVC 8-12 y la SvO₂>70%. En presencia de meningitis se debe tener en cuenta el riesgo de edema cerebral por lo que la adecuada monitorización es una exigencia pero los objetivos de expansión son los mismos.

2.1.9.3.4. Soporte vasoactivo

Además del fenómeno de fuga capilar, la fase inicial del shock séptico meningocócico está caracterizada por una disfunción miocárdica^{130,131}, la cual conlleva a edema agudo de pulmón y, por ello, una restricción del aporte de líquidos⁹⁹.

Si tras la expansión de volumen continua habiendo signos compromiso hemodinámico se debe iniciar el soporte vasoactivo. La amina de elección será la dopamina (dosis inicial 5 mcg/kg/min) por su efecto miocárdico (β-agonista) y vascular periférico (α-agonista), dosis dependiente. Del mismo modo, se prefiere la dobutamina por sus efectos beneficiosos sobre la función miocárdica y la oxigenación periférica¹³². Sin embargo, en ocasiones de inestabilidad hemodinámica es necesaria la administración de altas dosis de noradrenalina y otros alfa-adrenérgicos con el riesgo de empeorar la circulación periférica¹³³. En la actualidad no existe recomendación para el uso de la vasopresina y noradrenalina como fármacos de primera línea¹²¹.

Recomendación: Si tras dos bolos de 20 ml/kg siguen existiendo signos de compromiso hemodinámico se debe iniciar perfusión de dopamina (5 mcg/kg/min) pudiendo ser necesario añadir dobutamina (dosis inicial 5 mcg/kg/min), o incluso, noradrenalina, adrenalina o vasopresina de en shock séptico refractario^{99,123,133}.

2.1.9.3.5. Corticoides

Los datos encontrados en la literatura demuestran que en los niños con enfermedad meningocócica los niveles de cortisol al ingreso están inversamente relacionados con la respuesta inflamatoria de citoquinas y la severidad de la enfermedad. Los niveles altos de ACTH en estos pacientes sugieren la posibilidad de una insuficiencia suprarrenal “relativa”¹³⁴, es decir, una resistencia de los receptores tisulares a los corticoides¹³⁵. El uso de corticoides parece mejorar la situación hemodinámica y reducir las concentraciones de citoquinas proinflamatorias circulantes y de cortisol, elevar la citoquinas antiinflamatorias y reducir la mortalidad¹³⁶. Sin embargo, su uso permanece controvertido¹³⁷ ya que la mayoría de los estudios llevados a cabo no han mostrado beneficio significativo¹³⁸. En esta línea,

algunos trabajos han encontrado un aumento de la mortalidad relacionado con el uso de corticoides causado, en parte, por un mayor riesgo de infección, úlcera gastroduodenal y disminución de la penetrancia del antibiótico en el sistema nervioso central en pacientes con shock séptico¹³⁹. No obstante, en un reciente meta-análisis se concluye que, independientemente de la dosis o la duración del tratamiento, la administración de corticosteroides no afecta a la mortalidad; por el contrario, en pautas prolongadas y a dosis bajas se observó un descenso de la mortalidad a los 28 días¹⁴⁰. La asociación de mineralcorticoides en niños está discutida¹²¹.

Recomendación: En el momento actual, el uso de corticoides parece limitado al shock séptico refractario, es decir, los casos en los que se precisen dosis más altas de aminos vasopresoras, o bien, cuando exista una posible insuficiencia suprarrenal aguda, cifras de cortisol inferiores a 18 mg/dl¹⁴¹. En niños, la dosis recomendada de hidrocortisona será de 100 mg/m², o bien, 2-5 mg/kg, en una dosis de carga y 25mg/m² en las siguientes 6 horas^{125,142}.

2.1.9.3.6. Calcio

El calcio contribuye a mantener la tensión arterial. El calcio ionizado, el cual refleja el calcio “efectivo”, se encuentra disminuido debido a la acción de la IL-1⁹⁹ y, ello contribuye a mantener la depresión miocárdica y vasoplejia, así como, ocasionar trastornos del ritmo¹²¹. En los niños pequeños la hipocalcemia debe ser corregida de manera inmediata⁹⁹.

2.1.9.3.7. Otros

En el transcurso de una evolución fulminante y refractaria al tratamiento “convencional” otros fármacos como la naloxona han sido utilizados con el fin de eliminar el efecto cardiodepresor de las endorfinas y elevar, si bien de manera transitoria, la tensión arterial^{143,144}. Por otro lado, en las fases agudas de la enfermedad, el paciente puede presentar oligoanuria debido, en parte, a la necrosis tubular aguda o necrosis cortical que conduce a insuficiencia renal aguda. La anuria supone una urgencia vital y puede resultar en edema agudo de pulmón agravando la situación clínica por lo que se tendría que iniciar hemofiltración o diálisis lo antes posible⁹⁹. Además, en pacientes con rabdomiolisis grave (CPK>20000 U/L), se recomienda alcalinizar la orina con el fin de favorecer la eliminación de la mioglobina sin precipitar en los túbulos renales⁹⁹.

2.1.9.4. Estrategias dirigidas al control de la cascada inflamatoria

2.1.9.4.1. Proteína bactericida-permeabilizante (BPI)

La endotoxina es el principal elemento desencadenante de la respuesta inflamatoria que conduce al shock, fallo multiorgánico y púrpura fulminante en la meningococemia. La proteína bactericida-permeabilizante (BPI), liberada por los leucocitos polimorfonucleares tras su activación, ha demostrado, *in vitro*, poseer un efecto neutralizante sobre la endotoxina y, un efecto bactericida aumentando la permeabilidad de la membrana bacteriana y activando enzimas de degradación¹⁴⁵. El rBPI₂₁, un análogo de la molécula recombinante (rBPI₂₃) elaborado a partir de técnicas de ingeniería ha mostrado tener una adecuada estabilidad para su uso manteniendo su capacidad de inhibir la activación del complemento, la expresión de moléculas de adhesión endotelial y de neutrófilos, la formación de radicales libres y de citoquinas pro-inflamatorias incluyendo el TNF α . También, ha demostrado reducir la producción de óxido nítrico por el macrófago, potente vasodilatador implicado en la patogénesis de la hipotensión en el shock séptico⁴⁴.

En un estudio en fase III, randomizado, doble ciego y controlado en niños con sepsis meningocócica severa se observó que el grupo al que se le había administrado un fragmento recombinante modificado de la BPI (2 mg/kg en 30 minutos seguido de 2 mg/kg en 24 horas) presentaron, de manera significativa, menor incidencia de complicaciones vasculares (amputaciones) y mejor pronóstico funcional según la Pediatric Overall Performance Category Scale, que el grupo control^{93,145}. No obstante, previamente se había llevado a cabo un estudio similar con 393 pacientes en el que no se demostró un descenso de la mortalidad ni un mejor grado funcional al alta en el grupo tratado con rBPI₂₁ frente al grupo placebo⁹³.

Recomendación: Es necesaria la realización de más estudios controlados con suficiente potencia para demostrar una reducción de la mortalidad entre el grupo tratado con rBPI₂₁ frente al grupo placebo, así como la aparición de posibles efectos adversos antes de indicar su uso en niños.

2.1.9.4.2. Anticuerpo ha-1a

En un estudio llevado a cabo por Levin y cols¹⁴⁵, se observó que la administración del anticuerpo humano monoclonal contra la endotoxina, HA-1A, mejoró el pronóstico de las lesiones vasculares de los pacientes con disminución del número de amputaciones y de transfusiones⁹³. No obstante, no se ha demostrado una reducción significativa de la mortalidad en niños con shock séptico meningocócico¹⁴⁶.

Recomendación: Los escasos datos existentes al respecto no son suficientes para recomendar su aplicación.

2.1.9.4.3. Análogo del lípido A, E-5531

El lípido A es uno de los responsables de la respuesta inflamatoria a la endotoxina. La forma sintética del lípido A, E-5531, ha sido utilizada para bloquear los efectos sistémicos del LPS. El E-5531 actúa como antagonista de la interacción entre el LPS y el receptor de la endotoxina. Asimismo, E-5531 ha demostrado poseer un efecto inhibitor de la liberación del TNF- α . Un estudio llevado a cabo por Bunnell y cols. en voluntarios sanos mostró como tras la administración del E-5531 se observaba una disminución de los síntomas inducidos por el LPS así como un descenso de la concentración del TNF- α , IL-6, la proteína C reactiva y las cifras de leucocitos.

Recomendación: No existen en la actualidad suficientes estudios para aconsejar su aplicación en niños.

2.1.9.4.4. Otros anticuerpos

Otros tratamientos basados en anticuerpos, como los anticuerpos frente a TNF, receptores TNFsR, o IL-1Ra no han demostrado tener un efecto beneficioso en el tratamiento de la sepsis. De hecho, con algunos de ellos se han observado efectos perjudiciales. Del mismo modo, en un estudio prospectivo a doble ciego se utilizó suero de pacientes inmunizados con Escherichia Coli J5 sin encontrar diferencia significativa en la reducción de la mortalidad, lo cual podría estar justificado por la escasa potencia neutralizadora de los anticuerpos o el momento de administración^{146,147}.

Las terapias anticitoquinas no han sido utilizadas en la sepsis meningocócica. Sin embargo, puesto que los estudios comparativos han mostrado una activación de mediadores inflamatorios diferentes dependiendo de la afectación, la evolución, etc... es posible que una única terapia inmunomoduladora no sea efectiva¹⁴⁸.

2.1.9.5. Terapias dirigidas a tratar las alteraciones de la coagulación

2.1.9.5.1. Proteína C activada

Además de su efecto anticoagulante, la proteína C juega un papel importante como modulador de la respuesta inflamatoria¹⁴⁹. Varios trabajos han mostrado que los niveles de proteína C se encuentran disminuidos en pacientes con meningococemia severa debido a su consumo, inactivación y disminución de la síntesis y, además, este descenso se correlaciona con peor pronóstico¹⁵⁰. El valor

pronóstico de la proteína C depende de la concentración a la que se encuentre en las fases iniciales de la enfermedad ¹⁵¹. En un estudio llevado a cabo por Kleijn y cols. donde se administró concentrado de proteína C a niños con sepsis meningocócica severa se observó un aumento de la proteína C activada así como una mejora de la coagulación ¹⁵². También se observó un efecto beneficioso del uso de la proteína C en niños en el trabajo publicado por Martín-Torres y cols. A pesar de este efecto beneficioso, el uso de la proteína C sigue estando controvertido debido en parte al riesgo de hemorragia, de manera particular, en el sistema nervioso central ¹⁵³. En el estudio RESOLVE, llevado a cabo en niños de 38 semanas a 17 años, comparando la administración de proteína C activada frente a placebo, no se observó diferencia significativa en la recuperación ni mortalidad en el grupo al que se administró el fármaco. Tampoco se mostró aumento de riesgo de sangrado durante un período de 28 días en los niños que habían recibido proteína C reactiva¹⁵⁴. No obstante una reciente revisión de la Cochrane sobre el uso de proteína C activada en humanos no encuentra evidencias para recomendar su uso en pacientes con sepsis severa o shock séptico. Además, su uso parece estar acompañado de un mayor riesgo de sangrado¹⁵⁵.

Recomendación: En la actualidad no existen evidencias suficientes sobre el efecto que produce el uso de la proteína C activada por lo que no debería recomendarse su uso.

2.1.9.5.2. Antitrombina

La infusión de antitrombina parece mejorar la perfusión periférica y revertir el compromiso vascular con estabilización de los niveles de proteína C administrando una dosis de carga seguida de una de mantenimiento ^{156,157}

2.1.9.5.3. Factor activador del plasminógeno (t-pa)

El uso precoz de factor activador del plasminógeno a dosis de 0.25-0.5 mg/kg/h se asoció a una mejora en la estabilidad hemodinámica, así como, una reducción en la tasa de amputación. Sin embargo, en un estudio multicéntrico llevado a cabo por Zenz y cols. se observó alta incidencia de hemorragia intracerebral en niños con sepsis meningocócica en los que se había administrado t-PA ¹⁵⁸.

2.1.9.5.4. Sanguijuelas de uso medicinal

La hirudina, sustancia presente en la saliva de las sanguijuelas, inhibe la trombina, lo cual, podría jugar un papel beneficioso en la sepsis meningocócica. Las

sanguijuelas de uso medicinal han sido utilizadas recientemente en una niña de 8 meses con sepsis neumocócica y lesiones purpúricas con compromiso vascular periférico con resultado favorable ¹⁵⁹. Del mismo modo se han utilizado en la sepsis meningocócica en una lactante de 5 semanas sin observar un claro efecto beneficioso¹⁶⁰. Por tanto, si bien las proteínas salivares de las sanguijuelas de uso medicinal tienen un efecto teóricamente beneficioso son necesarios estudios controlados y amplios antes de considerar su uso ¹⁶¹.

2.1.9.5.5. Otros

Vitamina K: En aquellos casos donde existe un déficit de vitamina K, la administración de la misma normalizará los niveles de proteína C y S. No obstante, en otras situaciones su beneficio no está aclarado¹⁶².

La Ketanserina es un inhibidor antagonista de la serotonina con efecto alfa bloqueante débil. Si bien ha sido utilizada en la enfermedad de Raynaud como tratamiento de la claudicación intermitente, no se ha demostrado su beneficio en la púrpura fulminante¹⁶³.

El ácido ϵ -amino caproico, inhibidor de la fibrinólisis, podría frenar el proceso de necrosis cutánea en la púrpura fulminante¹⁶²

2.1.9.6. Terapias dirigidas al aclaramiento de moléculas pro-inflamatorias de la sangre

2.1.9.6.1. Recambio sanguíneo total o plasmático: plasmaféresis

El intercambio sanguíneo total o plasmático no solamente re-emplaza el plasma sino que repone varios inmunomoduladores como la anti-trombina III (AT-III) y C1 inhibidor y algunos factores anticoagulantes como proteína C y proteína S ⁹⁹. Algunos trabajos de series de casos sugieren un efecto beneficioso en el intercambio plasmático o sanguíneo completo con o sin leuco-aféresis ¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. Se ha comprobado que durante las técnicas de recambio plasmático se produce un descenso de los niveles de TNF. No obstante, debido a que los recambios se producen de manera intermitente el efecto global de la técnica sobre los niveles de TNF en las primeras 24 horas es limitado ¹⁶⁷.

2.1.9.6.2. Hemofiltración

Partiendo de la idea de que el aclaramiento de citoquinas proinflamatorias (TNF, IL-1) mejora la supervivencia, algunos trabajos describen el uso de la hemofiltración en la enfermedad meningocócica ¹⁶⁵. La presencia de TNF e IL-1 en el

ultrafiltrado no es suficiente para mejorar la supervivencia. Si bien, la hemofiltración o hemodiafiltración contribuyen al manejo de la hipervolemia, corrección de la acidosis y reducen la necesidad del uso de catecolaminas, su verdadero efecto sobre el pronóstico de la enfermedad permanece desconocido.

2.1.9.7. Tratamiento de la coagulación intravascular diseminada (CID)

Las medidas que se describen a continuación han sido empleadas en el tratamiento de la CID:

- La Heparina ha sido utilizada durante años en adultos ¹⁶⁸ y, aunque su uso parece disminuir la severidad de la necrosis distal, no se ha demostrado su efecto sobre la supervivencia ¹⁶⁹.
- Cuando la necrosis periférica progresa debe llevarse a cabo cirugía plástica o la amputación del miembro. Sin embargo, puesto que la cicatrización de las áreas isquémicas en los niños ha demostrado ser sorprendentemente buena se aboga por un tratamiento conservador siempre que se pueda ^{170,171}. La fasciotomía descompresiva, en general, ha demostrado resultados poco convincentes ¹⁷⁰.
- Los avances en el conocimiento de la fisiopatología de la coagulación intravascular diseminada puede abrir un camino hacia nuevas terapias. Algunas de las cuales ya están siendo probadas en modelos animales. El bloqueo de la vía extrínseca e intrínseca de la coagulación ha sido evaluado con la administración de suero de pacientes inmunizados con E. coli. Anticuerpos monoclonales contra el factor FXIIa atenúan la severidad del shock, mientras que anticuerpos contra el factor tisular influyen en la severidad del shock y la coagulopatía ¹⁷².
- La inhibición inespecífica de las serin-proteasas, complejo proteínico clave en la activación del complemento, sistema cinina-caliceína y sistema fibrinolítico, se intentó mediante la administración de la aprotinina en la década de los 60 ⁹⁹.
- La estimulación de la actividad fibrinolítica mediante la administración de estreptoquinasa o rTPA también se ha llevado a cabo pero debido a las altas concentraciones del factor inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) los efectos son limitados por el riesgo de sangrado ^{173,174}.
- La activación del zimógeno puede modular la depleción de inhibidores de las serin-proteasas como AT-III o C1-inhibidor. La AT-III inhibe la trombina, FXa, FIXa, FXIa y el FXIIa y parece tener un futuro prometedor en el manejo de la sepsis de diferente etiología en concreto la meningocócica

¹⁷⁴. El C1-inhibidor ha sido empleado en humanos en síndromes de sepsis “like” pero no en la EM. Su utilidad deriva de la potente actividad como regulador del complemento y activación del sistema quinina-caliceína.

- La transfusión de plaquetas está contraindicada porque aumenta la concentración del PAI-1 derivado de las mismas con el consiguiente empeoramiento de la isquemia periférica y necrosis.

Ninguna de las terapias comentadas previamente han demostrado tener un efecto claramente positivo ¹⁷⁵ en el tratamiento de la EM. No obstante, conociendo la existencia de las múltiples interacciones entre los mediadores de la inflamación este hecho no sorprende. En los adultos el plasma fresco congelado constituye la mejor alternativa en la expansión de volumen así como la inmunomodulación¹⁶⁴.

2.1.9.8. Estrategias terapéuticas que inducen vasodilatación

Con la finalidad de mejorar la perfusión acra se han utilizado diferentes terapias. El epoprostenol (prostaciclina) intravenoso es un potente vasodilatador, el cual ejerce un efecto inhibitor sobre la agregación plaquetaria. Se ha empleado en el tratamiento de la sepsis en neonatos y lactantes a dosis de 5-20 ng/kg/min sin signos de hipotensión descritos ¹⁷⁶.

La púrpura fulminante puede causar dolor severo secundario a la liberación de prostaglandinas en el tejido pobremente perfundido. La nitroglicerina tópica se convierte en óxido nítrico, el cual produce vasodilatación. Algunos estudios han mostrado el alivio del dolor a los 2-3 minutos de la aplicación de nitroglicerina tópica al 2% que puede ser repetida cada 4-6 horas ¹⁷⁷.

2.1.9.9. Otras estrategias terapéuticas

2.1.9.9.1. Oxigenación hiperbárica.

Con el fin de maximizar la oxigenación del tejido isquémico se ha empleado la oxigenación hiperbárica observando una reducción del área de necrosis en niños con púrpura fulminante^{178,179}.

2.1.9.9.2. ECMO.

En los últimos años la ECMO se ha utilizado como terapia de soporte en pacientes con shock séptico meningocócico o fallo respiratorio no hallando diferencia en la mortalidad en relación al tratamiento convencional ^{180,181} posiblemente debido al escaso número de pacientes a los que se les aplica.

2.1.9.10. Tratamiento de la meningitis

El tratamiento de la meningitis en ausencia de shock e hipertensión intracraneal se basa en el uso de antibióticos intravenosos y la monitorización estrecha de posibles complicaciones. La restricción de líquidos no está indicada ¹²⁶. El objetivo principal del tratamiento en la meningitis es alcanzar rápidamente niveles terapéuticos de antibiótico en el líquido cefalorraquídeo ¹⁸². Los antibióticos de elección son las cefalosporinas de 3ª generación (Cefotaxima 80 mg/kg/dosis, tres dosis/día; Ceftriaxona 50-80 mg/kg/dosis, una dosis/día). La duración del tratamiento será entre 5-7 días ¹²³. La realización de pruebas complementarias no debe retrasar el inicio del tratamiento.

Por otro lado, el uso de corticoides está indicado antes de la primera dosis de antibiótico. Si bien dosis de 0.15 mg/kg/día de dexametasona han demostrado un efecto beneficioso en la meningitis por haemophilus influenza, puesto que este efecto no ha podido observarse en otras meningitis, se discute el uso de corticoides en este contexto ¹⁸³. En casos de afectación grave o cuando exista riesgo de herniación cerebral, se debe iniciar antibioterapia empírica sin la confirmación mediante punción lumbar ¹⁸⁴. En general, la segunda punción lumbar de control no está indicada salvo que se observe un empeoramiento de la situación clínica a pesar de tratamiento antibiótico empírico.

2.1.10. Declaración, control y prevención

La identificación de brotes se lleva a cabo mediante la planificación de medidas de control y la determinación de los efectos que producen esas medidas, es necesario estableciendo la vigilancia tanto de la incidencia de casos como de los serogrupos, serotipos y serosubtipos responsables de la enfermedad. En general, las epidemias se deben a cambios en el serogrupo y serotipo predominante; también pueden observarse cambios en la distribución etaria²⁰.

2.1.10.1. Declaración obligatoria

La enfermedad meningocócica es de declaración nacional obligatoria, individualizada y urgente. Dado que todos los casos requieren hospitalización el mejor lugar para realizar la vigilancia es el hospital, concretamente el servicio de Medicina Preventiva, mediante la búsqueda activa de casos en los servicios, de urgencias, Pediatría, Medicina Interna y Microbiología²⁰.

La declaración de los casos permite, además de conocer la incidencia de la enfermedad, establecer la vigilancia de los convivientes y contactos, y administrarles, cuando esté indicado, quimioprofilaxis y vacuna.

En España existe, en el ámbito nacional, un laboratorio de Referencia de Meningococos dependiente del Centro Nacional de Epidemiología y, en el ámbito internacional, el Deposito de Neisserias de la Escuela de Salud Publica de la Universidad de California (Berkeley, Estados Unidos) y el Instituto de Medicina Tropical del Servicio de Salud del Ejercito, de Marsella centro colaborador de la OMS.

2.1.10.2. Encuesta epidemiológica

Permite conocer las circunstancias epidemiológicas que han contribuido a la aparición del caso, identificar los convivientes y contactos y determinar la convivencia o no de la quimioprofilaxis y vacunación.

En la encuesta epidemiológica se recogen los datos de filiación del paciente, antecedentes personales y familiares, antecedentes personales y familiares que puedan representar una mayor susceptibilidad a la enfermedad, datos del entorno social (características de la vivienda, convivientes domiciliarios, colegio, guardería), casos de enfermedad meningocócica que se hayan presentado en este entorno 30 días antes y actuaciones profilácticas que se hayan emprendido; datos clínicos y de laboratorio, y finalmente un apartado con el juicio final y las observaciones del médico que ha realizado la encuesta²⁰.

2.1.10.3. Profilaxis primaria

Si bien se conocen 13 serogrupos diferentes de *N. meningitidis*, solamente los serogrupos A, B, C, Y y W135 son patógenos confirmados. En la actualidad disponemos de vacunas frente a los grupos A, C, Y y W135 constituidas a partir de sus lipopolisacáridos capsulares. Desafortunadamente, estas vacunas no inducen una inmunidad linfocito-T dependiente por lo que son poco efectivas en niños y lactantes y no confieren inmunidad a largo plazo. Todavía no disponemos de una vacuna universal frente a meningococo B, pero en la actualidad se estan ensayando dos candidatos universales (vacuna rLP2086 y vacuna pentavalente basada en vacunología reversa) con resultados muy prometedores hasta la fecha^{44,185,186}.

2.1.10.3.1. Vacunas polisacáridas

Las vacunas polisacáridas se producen a partir de los polisacáridos capsulares purificados de los distintos serogrupos¹⁸⁷. Las primeras vacunas efectivas, realizadas a partir de polisacáridos capsulares, fueron desarrolladas hace más de 30 años a

partir de un brote epidémico entre soldados americanos recluidos¹⁸⁸. Posteriormente, su efecto fue probado en Europa, América Latina y África. Actualmente existe una vacuna tetravalente, aprobada en USA denominada Menomune® A, C, Y, W-135 (Aventis Pasteur), una vacuna bivalente frente a los grupos A y C que está disponible en todo el mundo y, desde el 2003, una trivalente, también, frente al serogrupo W135, agente potencialmente capaz de desencadenar grandes epidemias en los países del “cinturón de la meningitis”¹⁸⁹. Durante la estación epidémica en el “cinturón de la meningitis africano” el Grupo de coordinación internacional para la provisión de la vacuna para la epidemia de la meningitis constituido en 1997 por la OMS y otros colaboradores se encargan de distribuir la vacuna y asegurar la disponibilidad de la misma¹⁹⁰.

Las vacunas polisacáridas pueden desencadenar reacciones locales tales como hinchazón, enrojecimiento y fiebre (4-56%), pero, en general son bien toleradas¹⁹¹.

Sin embargo, las vacunas lipopolisacáridas son poco inmunogénicas en niños menores de 2 años, los cuales constituyen el grupo más susceptible de padecer la infección. En un estudio reciente llevado a cabo en Arabia Saudí, en el que participaron 423 niños menores de 5 años se observó una respuesta bactericida frente al serogrupo A mientras que los *N. Meningitidis* W135 fueron observados entre el 60-90% de los niños de 2-4 años respectivamente y solamente en el 25-13% de los lactantes de 6-12 meses respectivamente. Estas vacunas no indujeron memoria inmunológica. Se producía una respuesta que favorecía la liberación de IgM e IgG2, las cuales no son buenos activadores del complemento¹⁸⁶. La inmunogenicidad depende de la respuesta humoral del huésped a los antígenos polisacáridos la cual es adecuada en niños mayores de 2 años y adultos pero no en lactantes y adolescentes. Una única dosis de vacuna divalente frente a A y C proporciona inmunidad suficiente en niños jóvenes y adultos durante 5-10 años. Con dosis repetidas de vacuna polisacárida frente al serogrupo C se puede producir hiporreactividad frente a dicho serogrupo. La vacuna polisacárida frente al serogrupo A es inmunogénica en niños pequeños pero requiere múltiples dosis de administración. La vacuna frente a los serogrupos W-135 y Y consigue una adecuada inmunogenicidad y actividad bactericida. No obstante, su eficacia no ha sido demostrada en estudios controlados. La inmunización con la vacuna polisacárida A/C tuvo un pequeño efecto sobre el control de portadores nasofaríngeos del serogrupo A como se comprobó a los seis meses de la vacunación en Gambia. Sin embargo, estudios llevados a cabo en soldados italianos demostraron una reducción del número de portadores de los serogrupos A y C a las tres semanas de la vacunación pero se desconoce su eficacia a

largo plazo. En España, el porcentaje de portadores del serogrupo C, ha disminuido significativamente entre los vacunados frente a los serogrupos A/C^{42,185,192}.

Debido a su pobre inmunogenicidad en adolescentes y niños, la vacuna polisacárida no se recomienda en la actualidad en los calendarios de vacunación. Las indicaciones actuales de la vacuna tetravalente se reducen a aquellos que viajan a zonas endémicas (peregrinos a la Meca, previa visita a Arabia Saudí), los que tienen un déficit de las porciones finales del complemento y en los asplénicos. Por tanto, los soldados y el personal de investigación son candidatos a la vacunación estandarizada, como el resto de la población¹⁸⁸.

2.1.10.3.2. Vacunas conjugadas

Los experimentos llevados a cabo con las vacunas conjugadas frente a *Haemophilus influenzae* tipo b y a pneumococo han mostrado que mediante la conjugación química de una proteína transportadora se puede mejorar de manera significativa la inmunogenicidad del polisacárido bactericida¹⁸⁸.

Las vacunas conjugadas frente al grupo C fueron desarrolladas por Chiron y Wyeth empleando el toxoide de la difteria detoxificado genéticamente (CRM197) como proteína transportadora y por Baxter, utilizando el toxoide del tétanos como transportador. Estas vacunas fueron introducidas en noviembre de 1999 en Reino Unido al calendario vacunal a los 2, 3 y 4 meses de edad combinadas con una dosis recuerdo entre el año y los 18 años de edad. La cobertura de los adolescentes parecía tener un gran impacto en la incidencia de la enfermedad lo cual se tradujo en un descenso del 90% de las muertes y los casos de enfermedad y un 66% de los casos de portador. Llamativamente la vacuna también descendió un 70% el número de casos de enfermedad entre los no vacunados, con lo que se demostraba que se conseguía un efecto de inmunidad colectiva. Desde entonces esta vacuna está incluida en el calendario vacunal de Reino Unido en una pauta de 2+1, aunque hay evidencia de que una sola dosis confiere protección suficiente. También se realizaron estudios de coste-efectividad de la vacuna en Holanda y Canadá con buenos resultados^{42,193}.

La vacuna tetravalente conjugada incorpora polisacáridos de los serogrupos A, C, Y, W-135 unidos mediante enlace covalente a la toxina de la difteria. Esta vacuna ha demostrado una eficiencia del 100%. Un estudio llevado a cabo en USA, demostró que la vacunación de adolescentes reduciría en 18 millones de dólares el coste directo derivado de la enfermedad. No obstante el elevado precio de esta vacuna hace imposible su uso en países en vías de desarrollo⁴².

En junio de 2001, a través de la Organización Mundial de la Salud se desarrolló una vacuna conjugada frente al meningococo A a un precio abordable por los países subdesarrollados. En el 2006 se realizaron los estudios en fase I, seguidos de los estudios en fase II en Gambia y Mali para el uso de una dosis única en campañas de vacunación masiva en África. El problema radica en concienciar a los gobiernos y autoridades sanitarias de la necesidad de definir estrategias de financiación para la introducción de la vacuna y, la necesidad de priorizar el acceso a la misma a países epidemiológicamente desfavorecidos como aquellos que conforman el “cinturón de la meningitis”. En estos países se estima que existe entre 400 y 500 millones de personas entre 1-29 años susceptibles de recibir vacunación⁴².

2.1.10.3.3. Vacunas frente al meningococo B

La similitud entre la capsula del meningococo B y las sialoproteínas humanas presentes en el tejido neural fetal, ha truncado el desarrollo de vacunas conjugadas frente a B siguiendo la estrategia empleada exitosamente hasta la fecha con los otros serogrupos. Por ello se han establecido otras líneas de trabajo distintas, buscando antígenos inmunogénicos, estables y de representación universal, candidatos para la protección eficaz frente a meningococo B^{187,194}.

Dentro de la estrategia basada en proteínas de vesículas de membrana externa (OMVs), existen al menos cuatro tipos de vacunas frente al meningococo B: la cubana, comercializada en 20 países con el nombre de Vamengoe B=C, de la que se han utilizado más de 10 millones de dosis; la noruega; la estadounidense y la holandesa¹⁹⁴.

La vacuna cubana es una vacuna bivalente (BmasC), preparada en el Instituto Finlay de la Habana, que contienen polisacárido de meningococo C y una mezcla de proteínas de membrana externa de alto peso molecular, con lipopolisacárido y fosfolípidos (proteoliposoma), de la cepa B;4:P1.15, e hidróxido de aluminio. Se administró en Cuba, durante los años 1989-1990, en forma de campaña, a la población comprendida entre los 3 meses y los 19 años. En un estudio en escolares se comprobó una eficacia del 83%. A partir de 1991, se introdujo en el calendario de vacunas de la infancia a partir de los 3 meses de edad. Posteriormente se ha utilizado en distintos países, como Brasil, Ucrania, Colombia, Mongolia, Paraguay, Uruguay y Argentina. De 1989 a 1991, con motivo de una epidemia por los serogrupos B y C, se administraron en ocho estados de Brasil 11 millones de dosis. Se realizaron dos estudios de casos y controles. En el de Sao Paulo, en el que se vacunaron 2,4 millones de niños entre 3 meses y 7 años, se demostró una eficacia que variaba con la edad; en los mayores de 48 meses fue del 74% (IC 95%, 16=92%); en los menores de

esta edad no se demostró ninguna eficacia. En un segundo ensayo, el que se vacunaron con dos dosis a 1,7 millones de niños entre 6 meses y 9 años se observó una eficacia para toda la enfermedad meningocócica del 57,7% (IC 95%, 38=87%), que en los menores de esta edad fue del 28% (IC 95%, 45=65%), siendo más eficaz en los que viven en áreas de alto riesgo, y en los primeros 6 meses de observación que en los 6 meses siguientes¹⁹⁴.

La vacuna noruega contiene un complejo de proteínas de membrana externa (clase 1, 3 y 5) y lipopolisacáridos extraídos con desoxicolato para obtener microvesículas, de la cepa B:15:P1.7.16, aluminio y timerosal. Se ensayó entre 1989 y 1991, en 171.8000 escolares de 14-16 años de Noruega. Se administraron dos dosis con un intervalo de 6 semanas y se observó una eficacia del 58% después de 30 meses.

El instituto Walter Reed de las Fuerzas Armadas de Estados Unidos, en Washington, elaboró una vacuna experimental con proteína externa de la cepa B:15:P1.3:L3.7, que circulaba en el Iquique (Chile), unida al polisacárido capsular C, no vesiculada, con bajo contenido en lipopolisacárido y sin proteínas de la clase 5. En 1987 y 1989, se realizó un ensayo clínico administrando dos dosis separadas 6 semanas de intervalo a 40.000 personas entre 1 y 21 años; tras un seguimiento de 20 meses, se observó una efectividad del 51%. La protección fue dependiente de la edad, nula para los menores de 4 años y del 70% para los mayores de esta edad.

Otros antígenos candidatos para una vacuna alternativa son sobre todo las proteínas de clase 1, que tienen dos epítomos inmunodominantes VR1 y VR2, asociados con especificidad de serotipo y probable inducción de anticuerpos bactericidas.

Recientemente, en Gloucester (Reino Unido), se ha estudiado en lactantes de 2 meses¹⁹⁵ la inmunogenicidad y reactogenicidad de una nueva vacuna desarrollada por el Laboratorio para Investigación Clínica de Vacunas de Biltoven (Holanda). La vacuna consta de dos microvesículas que contienen, cada una, una cepa manipulada por tecnología ADN recombinante, que expresa tres porinas A. Las seis porinas A representan más del 80% de todos los aislamientos, con independencia de los serogrupo obtenidos en aquel país durante 1996. No contiene polisacárido capsular ni porina B y si pequeñas cantidades de proteínas de membrana externa clases 4 y 5. Se administraron tres dosis en el primer año (2, 3 y 4 meses) y un recuerdo en el segundo año de vida. Se observó una buena tolerancia, así como respuesta de anticuerpos bactericidas, con títulos protectores (>1/4) en el 95% tras la cuarta dosis. De Kleijn y cols¹⁹⁶, en el año 2001, describieron la adecuada tolerancia así como la actividad bactericida de la vacuna en escolares.

Otro antígeno importante es la proteína 5C, involucrada en la adherencia e invasión de las células epiteliales y endoteliales, por lo que los anticuerpos frente a ella pueden impedir la fijación y la entrada de la misma en la célula. Induce anticuerpos bactericidas y debe ser expresada por las cepas que se utilicen para preparar vacunas de proteínas de membrana externa. La vacuna noruega contiene proteína 5C.

Los LPS o lipooligosacáridos (LOS), detoxificados y en vacunas conjugadas también son importantes candidatos. Zollinger observó que entre el 65 y el 90% de los meningococos B aislados de enfermos expresan el inmunotipo LOS L3 y el L3.7. También son importantes candidatos las proteínas reguladoras de hierro, de las que el meningococo expresa cuatro o cinco de elevado peso molecular, con receptores específicos para la transferrina y la lactoferrina. Menor importancia tienen la lipoproteína H8, los Pili y las proteínas de clase 5¹⁹⁴.

En el momento actual existen dos estrategias de investigación en vacunación universal frente a meningococo B que se encuentran en fase de experimentación clínica. La primera se basa en la lipoproteína LP2086, recientemente identificada como proteína de unión del factor H, y de la que existen dos subfamilias (A y B). La otra se fundamenta en la vacunología reversa, y su formulación final incluye 5 antígenos proteicos (dos proteínas de fusión y un antígeno adicional) combinados con las OMVs utilizadas en Nueva Zelanda. La vacuna LP2086 está actualmente en fase I/II de desarrollo clínico, mientras que la otra ya ha entrado en fase III, ambas con resultados muy esperanzadores, y con coberturas teóricas superiores al 80% de las cepas de meningococo B que circulan actualmente en el mundo¹⁹⁴.

2.1.11. Pronóstico de la enfermedad meningocócica

La mortalidad de los pacientes afectados de enfermedad meningocócica depende fundamentalmente de la edad del paciente, el tipo de manifestación clínica (septicemia/meningitis), características de la bacteria (complejo clonal) y el manejo de la infección¹⁰⁷. No existen evidencias que demuestren que las nuevas terapias hayan tenido un impacto significativo sobre las complicaciones y la supervivencia de la enfermedad meningocócica¹⁹⁷.

De todas las variables implicadas, hasta el momento, sólo la vacunación y el uso precoz de antibioterapia han demostrado reducir la mortalidad y la tasa de complicaciones por la enfermedad^{107,198,199}. En la Figura 11 se compara la frecuencia

de complicaciones observadas entre un grupo al que se administró antibiótico tan pronto se sospechó la enfermedad frente al que no recibió antibiótico.

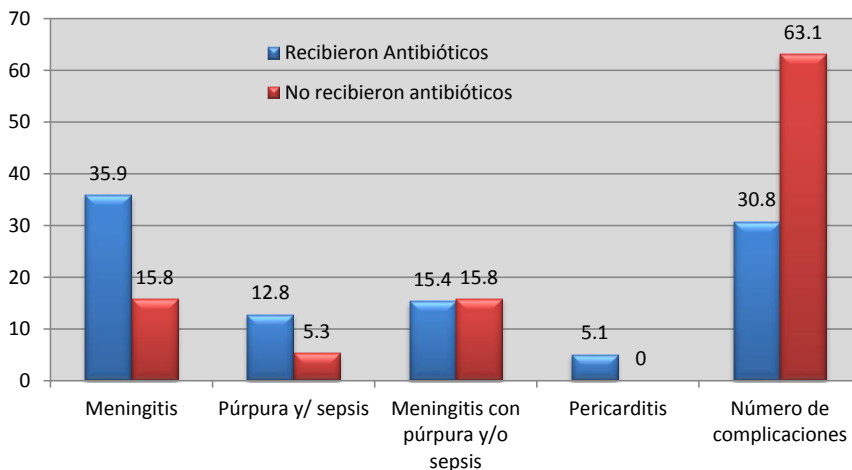


Figura 11. Frecuencia de complicaciones observadas en el grupo de pacientes que recibieron antibioterapia precozmente frente a los que no la recibieron. Adaptado de Wang y cols¹⁹⁹.

Por otro lado, la tasa de morbilidad que algunas series cifran entre el 20-40% de los casos, depende del grado de severidad y del manejo de la enfermedad. En el seguimiento a largo plazo estos pacientes pueden presentar: pérdida auditiva, complicaciones neurológicas, alteraciones del comportamiento y problemas psiquiátricos, complicaciones articulares, por ejemplo, asimetría en la longitud de los miembros inferiores que puede manifestarse incluso años después de padecer la enfermedad, necesidad de injertos cutáneos, insuficiencia renal particularmente en aquellos que precisaron alguna técnica de re-emplazo renal y el síndrome de estrés post-traumático que puede afectar a los niños y también a sus familias²⁰⁰.

A pesar de todo, la enfermedad meningocócica continúa siendo la primera causa de muerte por infección en los países industrializados. Antes de la era antibiótica, la mortalidad se situaba alrededor del 70-80% de los afectados. Tras la introducción de los antibióticos en el tratamiento la tasa de muertes por EM se vio reducida al 10-30% dependiendo de las series¹⁰⁷.

2.2. GENÉTICA Y ENFERMEDAD

2.2.1. Variación genética: mutación y polimorfismo

Cada célula del cuerpo sintetiza varias proteínas diferentes. Estas proteínas incluyen enzimas y componentes estructurales que intervienen en todos los procesos metabólicos y de desarrollo de un organismo. La secuencia codificadora de bases en el ADN de un determinado gen posee una secuencia de aminoácidos específica. Por tanto un cambio de nucleótidos o **mutación** de la secuencia codificadora de un gen conduce a la formación de una proteína estructuralmente diferente que puede tener alteradas sus propiedades²⁰¹.

Sin embargo, otras modificaciones del ADN pueden no tener un efecto fenotípico, ya sea porque el cambio no altere la secuencia de aminoácidos primaria de un polipéptido o porque la modificación en la secuencia de aminoácidos codificada ocurra en una región no importante del polipéptido. Por tanto, muchas proteínas existen normalmente en una o más formas relativamente comunes, distintas desde el punto de vista genético y, diferentes en cuanto a su estructura. Dicha situación se conoce como **polimorfismo**²⁰¹.

El polimorfismo genético se define como la presencia de múltiples alelos en un locus, en el que al menos dos alelos aparecen con frecuencias mayores al 1%. La existencia de diferentes versiones del mismo material genético en personas distintas constituye algo más que una curiosidad interesante sólo para el genetista humano. El valor principal de los polimorfismos radica en su uso como «marcadores» genéticos que sirven para distinguir las diferentes formas hereditarias de un gen en estudios familiares. Los marcadores genéticos poseen una enorme utilidad práctica en la genética médica entre la que destaca el estudio del riesgo de predisposición a enfermedades, formas de presentación y pronóstico de las mismas.

2.2.2. ADN mitocondrial

2.2.2.1. La mitocondria

La mitocondria es un orgánulo celular pleomórfico, localizado en el citoplasma de las células eucariotas. Está compuesta por dos membranas (una exterior lisa y otra interna crestada, que delimitan el orgánulo en dos

compartimentos), el espacio intermembrana y, la matriz mitocondrial. Ambas membranas difieren tanto en su composición como en su función.

La **membrana externa** es rica en colesterol y muy permeable, contiene porinas que permiten el paso de moléculas pequeñas (> 5000 Daltons) desde el citoplasma hacia el interior del espacio intermembrana (Figura 12).

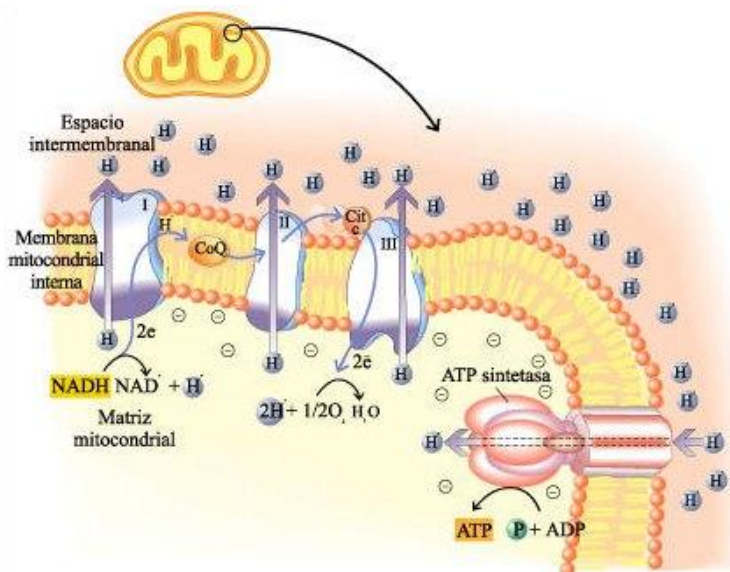


Figura 12. Esquema de la membrana mitocondrial y las reacciones metabólicas que se llevan a cabo en la misma. (Extraído de www.fisicanet.com)

La **membrana interna** presenta múltiples proyecciones denominadas crestas mitocondriales las cuales incrementan notablemente su superficie. En su cara interna se localizan los corpúsculos elementales, complejos proteicos en forma de palillo de tambor con actividad ATP sintetasa. También se ubican en ella las proteínas de la cadena respiratoria, compuesta por tres complejos, el complejo de la NADH deshidrogenasa, el complejo citocromo b-c1, y el complejo de la citocromo oxidasa. En su conjunto forman una cadena de transporte de electrones encargada de actuar como una bomba de protones que lleva H^+ desde la matriz hacia el espacio intermembrana, creando un gradiente electroquímico que proporciona la energía necesaria para la acción de la ATP sintetasa durante el proceso de síntesis del ATP y reduciendo el O_2 en agua (Figura 12).

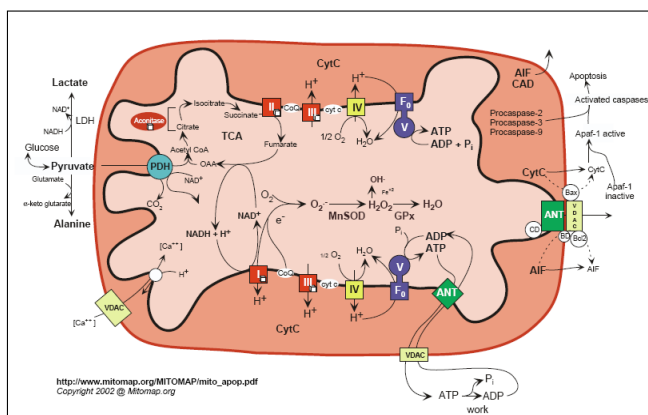


Figura 13. Esquema de las principales rutas metabólicas llevadas a cabo en la mitocondria (adaptado de Mishmar y cols. 2003)

La matriz mitocondrial está compuesta por una sustancia granular y electrodensa rica en proteínas, muchas de las cuales están encargadas de la degradación de los ácidos grasos y del piruvato a acetil CoA, y de la oxidación de este último en el ciclo del ácido tricarbóxico o ciclo de Krebs. La mitocondria no sólo es la responsable de la obtención de ATP mediante el proceso de la fosforilación oxidativa gracias al cual la célula obtiene energía, sino que está a su vez involucrada en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), y en la regulación del proceso apoptótico. También se localizan en la matriz los ribosomas mitocondriales, el ARNt, el ARNm, y las enzimas necesarias para la expresión del ADN mitocondrial (ADNmt).

La función y el número de mitocondrias oscilan en función de las necesidades celulares, de ese modo células musculares y neuronales, con una tasa de respiración elevada presentan mitocondrias extremadamente ricas en crestas y muy electrodensas, y al contrario, células hepáticas con una tasa de respiración inferior presentan menor número de mitocondrias y a su vez éstas son menos electrodensas.

2.2.2.2. Arquitectura del ADN mitocondrial

Las mitocondrias se encuentran en todas las células nucleadas y representan la única organela que contiene ADN (exceptuando los cloroplastos en las plantas). La

función de la mitocondria se regula en el núcleo y en la propia mitocondria. Las mitocondrias son las fuentes energéticas más importantes de las células; su función principal es la fosforilación oxidativa y la producción de 5'-adenosin-trifosfato (ATP) la cual constituye la moneda energética para poder llevar a cabo las reacciones metabólicas del organismo.

El genoma mitocondrial está compuesto por aproximadamente 16.569 pares de bases (pb) y codifica para 37 genes densamente empaquetados: 13 genes que codifican para proteínas estructurales esenciales de la cadena respiratoria (sub-unidades I, III, IV, y V de los complejos del sistema de fosforilación oxidativa), dos que codifican para proteínas del ARN_r, (16S y 12S), y 22 para proteínas del ARN_s, necesarios para la maquinaria de traducción del ADN_{mt} (Anderson et al. 1981). El resto de las proteínas mitocondriales que forman parte de los complejos de la cadena respiratoria, así como todas las proteínas que son necesarias para el mantenimiento del genoma mitocondrial y de la mitocondria, son codificados en el núcleo, sintetizados en los ribosomas citoplasmáticos, y transportados dentro de los orgánulos mitocondriales. Los genes mitocondriales se organizan de manera continua sin apenas espacios inter-génicos, con la única excepción de un segmento pequeño conocido como *displacement loop* (D-loop), que contiene los elementos reguladores del control de la replicación y de la transcripción del ADN_{mt}.

En el ADN mitocondrial se han descrito diversos cambios en la secuencia del genoma, ocasionando diversos polimorfismos de un único nucleótido. Uno de los haplotipos, el más frecuente en la población europea (H) se ha asociado a diferentes enfermedades y se postula que se asocia a un aumento de la actividad de la cadena respiratoria²⁰².

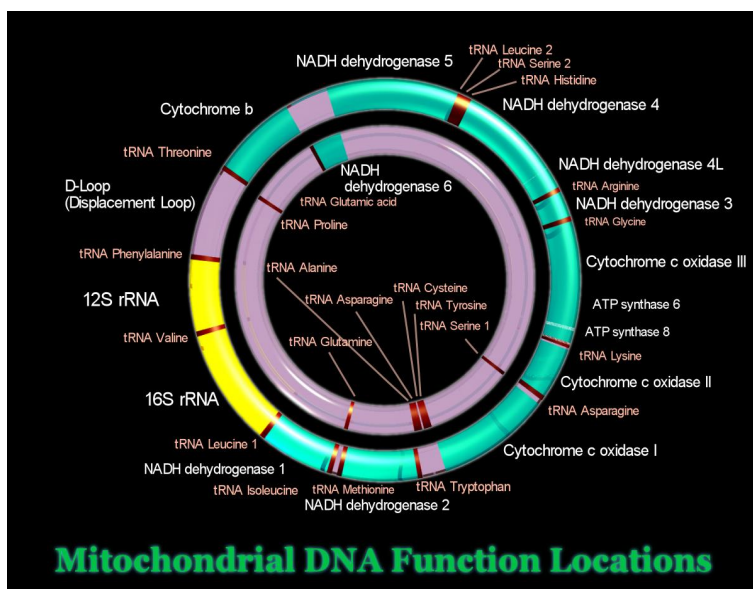


Figura 14. Arquitectura del ADN mitocondrial.

El ADN_{mt} se transmite de madres a hijos (herencia uniparental; matrilineal) a diferencia del genoma nuclear autosómico (herencia biparental). Se estima que hay entre cinco y diez copias de genoma mitocondrial por mitocondria y varios cientos o miles de mitocondrias por célula. En ocasiones, existe más de una variante mitocondrial (distintas poblaciones de ADN_{mt}) dentro de una célula (o tejido); este estado se conoce como heteroplasma²⁰³. La mezcla de diferentes tipos mitocondriales se puede heredar (en porcentajes variables de mitocondrias ‘salvajes’ y mutantes) o puede surgir durante la vida de un individuo como consecuencia de la mutación somática. Esto es debido a que las mitocondrias y el ADN_{mt} están en constante renovación dentro de las células, y la partición de las mitocondrias en células hijas es puramente un proceso estocástico, por tanto, los niveles de heteroplasma pueden cambiar dramáticamente dentro de un individuo y dentro de un tejido en el curso de la división celular. En individuos con heteroplasma y enfermedad mitocondrial, los niveles de moléculas de ADN_{mt} mutadas son a menudo diferentes en sangre y en células musculares²⁰⁴. El nivel de heteroplasma para la variante causal determina generalmente la gravedad de la patología. Algunos autores han propuesto que los niveles de heteroplasma incrementan con la edad²⁰⁵.

2.2.2.3. Características específicas de la genética mitocondrial

Las características que diferencian claramente el ADN_{mt} del ADN_n son:

- A. El tipo de herencia del sistema genético mitocondrial (uniparental).
- B. Su localización en una organela citoplasmática.
- C. La disposición continua de los genes sin nucleótidos intermedios ni intrones.
- D. La heteroplasma (alto número de copias en cada célula).

Cada célula contiene entre 1000 y 10000 copias de ADN_{mt} dependiendo del tejido, pasando por unos cuantos cientos en los espermatozoides y hasta unos 100.000 en el oocito.

A continuación se describen algunas de sus características más importantes:

- a) Herencia materna. El ADN_{mt} se hereda por vía materna con un patrón vertical no mendeliano. La madre transmite su genoma mitocondrial a todos sus hijos, pero solamente las hijas lo pasarán a todos los miembros de la siguiente generación y así sucesivamente. De ello se desprende el elevado número de moléculas de ADN_{mt} que existe en los óvulos (entre 100000 y 200000 copias)²⁰⁶.
- b) Segregación mitótica. El fenotipo de una línea celular puede variar durante la división celular debido a que las mitocondrias se distribuyen al azar entre las células hijas, por lo que, en una célula coexisten dos poblaciones de ADN_{mt}, una normal y otra mutada (heteroplasma), a lo largo de las divisiones se podrán originar tres genotipos diferentes: homoplásmico para el ADN_{mt} normal, homoplásmico para el ADN_{mt} mutado y heteroplásmico. Por tanto, el fenotipo de una célula con heteroplasma dependerá del porcentaje de ADN mutado que contenga. Si el número de moléculas de ADN_{mt} dañado es relativamente bajo se produce una complementación con las moléculas de ADN normal y no se manifestará el defecto genético. Cuando el DNA mutado subrepassa un umbral determinado se manifestará un fenotipo patogénico (efecto umbral), es decir, si la producción de ATP llega a estar por debajo de los mínimos necesarios para el funcionamiento de los tejidos, debido a la producción defectuosa de proteínas codificadas en el ADN_{mt}, se produce la aparición de la enfermedad. El número de moléculas de ADN_{mt} es diferente en cada órgano y tejido según la cantidad de energía requerida para su funcionamiento. Por ello, los tejidos que preferentemente se afectan son

la visión, el sistema nervioso central, el músculo esquelético, el corazón, los islotes pancreáticos, el riñón y el hígado²⁰⁶.

- c) Alta tasa de mutación. El ADNmt presenta una tasa de mutación espontánea de hasta 10 veces superior a la del ADN nuclear. Este fenómeno puede estar causado porque en la mitocondria se producen continuamente radicales de oxígeno, como consecuencia de la oxidación final de los compuestos carbonados, que pueden dañar a un ADN que no está protegido por proteínas. Debido a este hecho, la variación de secuencias entre individuos de una misma especie es muy grande, hasta unos 70 nucleótidos, y en un mismo individuo se estará generando a lo largo de la vida una pequeña heterogeneidad en el ADNmt. De este modo, se ha llegado a proponer que la disminución en la capacidad respiratoria de los tejidos, que tiene lugar en el envejecimiento, pueda ser debida a una acumulación de este daño mitocondrial. Esta teoría tiene su primera evidencia en un trabajo del grupo de Attardi, que documenta que las mitocondrias se deterioran con la edad como consecuencia de la acumulación de mutaciones²⁰⁷. Las variaciones de secuencia existentes entre diferentes individuos han resultado también muy útiles para estudios antropológicos, etnológicos y forenses y es la base de la hipótesis de que el hombre desciende de una mujer que vivió en África hace unos 250000 años ("Eva mitocondrial")²⁰⁶.

d) Tasa de mutación del genoma mitocondrial. Existe una marcada heterogeneidad mutacional en la molécula de ADNmt. En promedio, la tasa de mutación es aproximadamente 10 veces superior al promedio de la tasa del DNA nuclear (ADNn). En la región control esta tasa puede ser de 100 a 200 veces más alta que el promedio del ADNn. Las mutaciones pueden generarse durante el proceso de fosforilación oxidativa, y probablemente implique especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas en la cadena respiratoria mitocondrial. Se cree que el aumento de ROS en la matriz mitocondrial favorece la mutabilidad del genoma mitocondrial que, por otra parte, no presenta la protección proteica que caracteriza al genoma nuclear (histonas) y por lo tanto es más susceptible a la mutación²⁰⁸. Los mecanismos de reparación de ADNmt son escasos o nulos, a diferencia de las actividades correctoras que caracterizan a las polimerasas nucleares; esto obviamente contribuye a la acumulación creciente de mutaciones en el genoma mitocondrial ante la presencia de

determinados agentes químicos con efectos mutagénicos tales como las ROS. El D-loop adapta una arquitectura en triple cadena, generada por la síntesis de un fragmento corto a partir de la cadena pesada del genoma mitocondrial. Esta molécula es particularmente sensible al daño oxidativo debido a su estructura en cadena sencilla. El ADN mitocondrial codifica algunas de las proteínas que componen la cadena respiratoria. Dicha cadena contiene cinco complejos multiméricos y debe su trascendencia a que es el mecanismo para la producción de energía mediante la síntesis de adenín trifosfato (ATP). En el ADN mitocondrial se han descrito diversos cambios en la secuencia del genoma, caracterizándose diversos polimorfismos de un único nucleótido. Uno de los haplotipos, el H que es el más frecuente en la población europea, se ha asociado a diversas enfermedades, y además, se postula que se asocia a un incremento de la actividad de la cadena respiratoria lo cual podría tener una importante repercusión en tejidos como el sistema nervioso central, el músculo esquelético o el corazón.

2.2.2.4. ADN mitocondrial y enfermedad

Hasta hace no muchos años la genética mitocondrial y la enfermedad debida a defectos en el genoma mitocondrial eran vistos como una mera curiosidad, manteniéndose fuera de las corrientes principales de investigación en genética humana. Las características tan peculiares de la mitocondria y en particular de su genoma facilitaron que esta visión se mantuviera durante muchos años. Los síndromes clínicos causados por mutaciones en el ADNmt poseen fenotipos muy variables y a menudo fueron y son descritos a través de epónimos y acrónimos fáciles de olvidar.

Esta visión tan limitada de la patología relacionada con la mitocondria contrastaba con el uso tan intenso que se le estaba dando a este mismo genoma en otras áreas de la investigación genética, tales como la genética evolutiva y poblacional (donde fue y sigue siendo un marcador de referencia), o la genética forense (para establecer relaciones de parentesco matrilineal, identificación de linaje, estudio de muestras degradadas, DNA antiguo, etc.).

Hoy se sabe que el genoma mitocondrial es una causa de enfermedad en poblaciones humanas, y no solo la enfermedad estrictamente mitocondrial. Las enfermedades originadas por daños en el genoma mitocondrial tienen en común el estar producidas por una deficiencia en la biosíntesis de ATP, ya que toda la información que contiene este ADN está dirigida a la síntesis de proteínas

componentes del sistema OXphos. Las mutaciones que alteran los genes mitocondriales conducen a enfermedades que afectan tejidos que no presentan división celular, tales como el sistema nervioso central, el músculo esquelético, y el miocardio^{209,210}.

En cuanto a la prevalencia de las patologías mitocondriales, se estima que al menos uno de cada 8.000 individuos son portadores de una mutación patogénica mitocondrial²⁰⁴. La mutación A3243G (asociada a MELAS), por ejemplo, tiene una prevalencia de 1 en 6.000 habitantes en Finlandia. En Inglaterra se estima que cerca de 1 de cada 3.500 habitantes tiene una enfermedad mitocondrial o están en riesgo de tenerla. Estas tasas no tienen en cuenta las evidencias que sugieren la asociación de determinadas mutaciones mitocondriales con un amplio espectro de enfermedades complejas tales como la hipertensión, diabetes, etc. También se han sugerido la asociación entre el ADNmt y enfermedades degenerativas^{207,211}; y neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer)²¹², la edad y el envejecimiento^{205,213}. Por último, en estos últimos años, el papel potencial del genoma mitocondrial está siendo un tema de investigación de intenso debate en oncogenética^{208,214,215}.

Actualmente no existen medios adecuados para evaluar el significado patológico de una mutación mitocondrial. Generalmente la patogenicidad de una mutación se evalúa de forma empírica, esto es, estudiando la relación causa-efecto, entre el cambio mutacional específico y el fenotipo clínico derivado de la afección mitocondrial. También de los estudios funcionales, y el estudio de la variabilidad natural en las poblaciones (polimorfismos) se puede derivar información sobre la patogenicidad de la mutación. Es muy complicado generalmente juzgar cuando una mutación no es más que un polimorfismo neutral²¹⁶⁻²¹⁸. Además, las interacciones de la mitocondria y/o el ADNmt con el ADN nuclear complican significativamente las interpretaciones²¹⁹.

Desde que en 1988 se describieran las primeras enfermedades causadas por daños en el ADNmt, se han encontrado más de 150 mutaciones asociadas a enfermedades humanas. El interés por su estudio ha crecido enormemente debido al gran aumento de pacientes diagnosticados con estos trastornos que se presentan desde el recién nacido hasta el adulto. Además, muchas enfermedades se transmiten por línea materna, como se ha indicado anteriormente, lo que hace que el diagnóstico en un individuo pueda tener implicaciones en muchas generaciones de una familia. Del mismo modo cobra importancia en la esfera del diagnóstico prenatal.

A pesar de la importancia que tienen las enfermedades mitocondriales hasta ahora no se han realizado estudios exhaustivos sobre su prevalencia en la población general. Las razones son múltiples: complejidad de las manifestaciones clínicas, necesidad de biopsias musculares para su diagnóstico (no siempre se pueden detectar las mutaciones en muestras de sangre), necesidad de secuenciar todo el genoma mitocondrial para poder localizar mutaciones no detectadas hasta ahora, problemas éticos para realizar análisis genéticos presintomáticos en niños, diagnóstico erróneo de muchos pacientes al no ser atendidos en centros especializados,... No obstante, el grupo del doctor Turnbull (Reino Unido) ha publicado recientemente los primeros datos epidemiológicos de las enfermedades del ADNmt, centrados en la población blanca de Europa del Norte residente en el noreste de Inglaterra. Así ha mostrado que los defectos en el ADNmt son la causa de enfermedad en 6,57 de cada 100000 individuos de la población adulta trabajadora y que 7,59 por cada 100000 adultos y niños no afectados corren el riesgo de desarrollar una de estas enfermedades. En total, 12,48 por 100 000 individuos (1 de cada 8000) tienen o presentan un riesgo de padecer una enfermedad causada por daños en el ADNmt²⁰⁶.

2.2.2.5. Mitocondria y sepsis

La evolución del ADN humano se ha visto influenciada por las enfermedades infecciosas que han ido padeciendo los hombres a la largo de la historia. Si bien la mayoría de los estudios han sido dirigidos al análisis de la respuesta inmune del huésped, la recuperación tras la sepsis está directamente relacionada con la reserva fisiológica del huésped que depende de manera crítica de la función mitocondrial.

Existen evidencias recientes que sugieren que ciertos haplogrupos del ADNmt tienen una importancia funcional que aumentan la susceptibilidad de padecer cierto tipo de enfermedades. Además, en Europa, el haplogrupo H se ha asociado a un aumento de la actividad de la cadena respiratoria lo cual podría jugar un papel en la fisiopatología de algunas enfermedades.

En la infección meningocócica se desencadena una respuesta inflamatoria que si bien en la mayor parte de los casos es autolimitada, en otros, se produce una cascada de reacciones en cadena que inducen la liberación de citoquinas las cuales a su vez, activan células inflamatorias de otras localizaciones. Dicha respuesta inflamatoria, intensa y generalizada conlleva, en ocasiones, al fallo multiorgánico y al desenlace fatal. Se postula que en el desarrollo de dicho fallo durante la sepsis severa está involucrado un déficit del oxígeno celular. Diversos estudios sugieren que una disfunción mitocondrial sería responsable de una “disoxia” tisular, es decir, una incorrecta respiración celular a pesar de un adecuado envío de oxígeno a los tejidos,

y del fallo orgánico en la sepsis²²⁰⁻²²². Aunque indudablemente tiene lugar una redistribución del flujo microvascular, se ha observado un incremento en la tensión de oxígeno en los órganos de aquellos pacientes que sufren una sepsis. Este hallazgo sugiere que el principal defecto tendría lugar en el uso del oxígeno celular, en lugar de presentarse en el transporte de éste.

Estudios epidemiológicos sugieren que una muerte prematura como resultado de un cuadro infeccioso tiene un fuerte componente genético, y la propia variación natural en el ADN mitocondrial aportaría una explicación potencial. Más del 98% del oxígeno celular enviado a los tejidos es utilizado por la cadena respiratoria mitocondrial para producir ATP, la principal fuente de energía intracelular.

La cadena de transporte de electrones está compuesta por cuatro complejos enzimáticos (I-IV) (Ver figuras 12 y 13). Estos complejos pueden ser inhibidos por especies reactivas de oxígeno y especies nitrogenadas como el óxido nítrico. Las especies reactivas se producen en exceso durante la sepsis, a la vez que pueden ser generadas por la propia mitocondria²²³. La inhibición del complejo I por parte del óxido nítrico está facilitado por la reducción del antioxidante glutatión reducido. Se ha demostrado que este antioxidante intracelular se encuentra reducido en estados de sepsis^{224,225}. Brealey y cols.²²³ observaron que en los pacientes con shock séptico existe una asociación entre la superproducción de ácido nítrico, la reducción de antioxidante, la disfunción mitocondrial y la disminución de la concentración de ATP, lo que le llevó a concluir que el fallo bioenergético constituye un importante mecanismo fisiopatológico en la disfunción multiorgánica. La cadena respiratoria mitocondrial consume más del 98% del oxígeno entregado a las células para producir ATP, la principal fuente energética celular. Recientes investigaciones sugieren que la disfunción mitocondrial es la responsable de la “disoxia” celular y el fallo multiorgánico en la sepsis. De acuerdo con esto, una alteración en la función mitocondrial en pacientes con sepsis está asociada con un peor pronóstico. No obstante, por qué este fenómeno se produce más en unos individuos que en otros se desconoce en la actualidad¹⁶.

2.2.2.6. ADN mitocondrial y sepsis

Un grupo de Reino Unido, ha publicado recientemente el resultado de la evaluación de la posible asociación del haplotipo H con la mortalidad en 150 pacientes que ingresaron en UCI con sepsis grave. Se genotiparon 542 controles sanos de la misma edad. Los autores observaron que la frecuencia de presentación del haplotipo H no difería entre los pacientes con sepsis y la población control, por lo que poseer dicho haplotipo no parece ser un factor predisponente para el desarrollo

de sepsis grave y el haplotipo H es un factor independiente de mortalidad tardía (a los 180 días)¹⁶.

En la década de los 90 se publicaron los primeros estudios que identificaron dos polimorfismos del gen del factor de necrosis tumoral, el cual se encuentra en el brazo corto del cromosoma 6, asociándolo a una mayor mortalidad en pacientes con sepsis grave o shock séptico.

La determinación de un único polimorfismo puede producir resultados discordantes por lo que algunos investigadores han realizado la determinación de haplotipos (conjunto de alelos polimórficos que ocurren en un cromosoma) de un determinado gen, analizando su asociación con el pronóstico. Así se ha demostrado en 228 pacientes con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica que el haplotipo 174/G1753C/2954G de la IL-6 se asocia a una menor mortalidad que los restantes haplotipos de estos tres polimorfismos de un único nucleótido. De igual modo, se ha demostrado que el haplotipo -592C/734G/3367G del gen de la IL-10 se asocia a una mayor mortalidad en pacientes con sepsis, sólo cuando el origen es pulmonar, pero no en otros focos de infección²⁰².

Recientemente, en un trabajo llevado a cabo por Yang y cols²²⁶ en la población de Han, se encontró que el haplogrupo R es un predictor independiente de pronóstico de la sepsis severa observando supervivencias más largas en comparación con los individuos sin este haplogrupo.

2.2.3. Estudios de asociación y enfermedad multifactorial

En las últimas décadas la genética y los estudios de asociación han contribuido significativamente al avance del conocimiento de la fisiopatología de múltiples enfermedades, y de forma particular, también dentro del campo de la pediatría. Esto ha supuesto una revolución en las estrategias de investigación, un desafío en el desarrollo de nuevas terapias, pero también exige una adaptación y actualización por parte del pediatra que quiere conocer los pros y contras de estas nuevas metodologías e integrarlas en su trabajo cotidiano o de investigación. En este artículo se revisan y discuten las bases conceptuales necesarias para la utilización e interpretación de estas nuevas herramientas aplicadas a la pediatría.

El término de *enfermedad compleja* se aplica a aquellas patologías de causa multifactorial, es decir, aquellas en cuyo origen interaccionan factores ambientales y factores genéticos. Algunos ejemplos de este tipo de enfermedades complejas, muchas de ellas de gran importancia en la infancia, son: diabetes, algunos tipos de

cáncer, enfermedades infecciosas (enfermedad neumocócica, enfermedad meningocócica), enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca, obesidad, trastorno por déficit de atención e hiperactividad, etc. El conocimiento de los genes implicados en el desarrollo de estas enfermedades nos permite predecir el riesgo, susceptibilidad, pronóstico o resistencia a desarrollarlas.

2.2.3.1. Estudios de casos y controles

Los estudios de asociación genética intentan responder a la pregunta: ¿qué papel juega el componente genético de los individuos en el desarrollo, forma de presentación y pronóstico de las enfermedades?

Los estudios de asociación de casos-controles son conceptualmente sencillos: las variantes genéticas de riesgo tenderán a presentarse con mayor frecuencia en una muestra de casos (individuos afectados) que en una muestra de controles (individuos sanos). Lo contrario ocurriría para una variante genética protectora. Existen varios pasos que se deben seguir a la hora de diseñar un estudio de asociación caso-control:

- a) Recogida de un número suficiente de casos y controles que permita detectar la presunta asociación de la variante genética que estamos analizando con la enfermedad;
- b) Selección de las variantes genéticas (SNPs) que van a ser analizadas;
- c) Genotipado de los SNPs;
- d) Análisis estadístico de los resultados con el fin de valorar si las variantes genéticas estudiadas están o no relacionadas con la enfermedad o algún aspecto de su evolución.

2.2.3.2. Selección de SNPs

Existen varias maneras de abordar el estudio genético de una enfermedad. En el caso más sencillo, el investigador, usando sus casos y controles, puede desear replicar una asociación previamente descrita en la literatura de un SNP concreto. Esto sucede a menudo en los estudios de asociación ya que existen muchos factores (algunos de ellos mencionados previamente) que generan falsos positivos de asociación.

El investigador podría plantearse la hipótesis de que algún grupo de genes podría estar relacionado con una determinada patología (genes candidatos). Para estudiar la presunta asociación de estos genes con la enfermedad, se deberán seleccionar las variantes genéticas (SNPs) dentro de estos genes para posteriormente ser genotipadas en su muestra de casos y controles. Además de HapMap, existen otras muchas fuentes de información (bases de datos públicas accesibles por

cualquier investigador en internet), así como, herramientas bioinformáticas para seleccionar los SNPs de interés.

Por otro lado, un proyecto de asociación mínimamente ambicioso requiere un gran esfuerzo de genotipado. Por ejemplo, genotipar tan sólo 100 SNPs en 400 casos y 400 controles, son en total 80.000 genotipos. Afortunadamente, hoy en día existen métodos y 'plataformas' de genotipado que permiten obtener miles de genotipos en pocos días a un precio razonable que lo hace cada vez más accesible a un mayor número de investigadores y laboratorios. Dependiendo del número total de genotipos y muestras a genotipar uno puede determinar cuál es la plataforma más adecuada.

2.2.3.3. Genome-wide association studies (GWAS)

En el estudio genético de la enfermedad compleja, existe otra alternativa cada vez más demandada en la comunidad científica. Se trata del 'barrido genómico', técnica hoy en día más conocida como genome-wide association studies (GWAS). En este tipo de estudio no existe una hipótesis preconcebida (como es el caso del 'gen candidato'), sino que se trata de estudiar muchos miles de SNPs distribuidos a lo largo de todo el genoma en búsqueda de algún gen que pudiera estar asociado con la patología. Actualmente, existe un gran número de compañías que comercializan este tipo de análisis de genotipado lo cual facilita la labor del investigador. La gran desventaja de estos estudios es su alto coste; además, el análisis de los datos de un GWAS presenta importantes retos desde el punto de vista estadístico y de interpretación de resultados.

3. JUSTIFICACIÓN

“La verdadera grandeza de la ciencia acaba valorándose por su utilidad”.

(Gregorio Marañón)

En el siglo XXI, y a pesar de los avances en la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad meningocócica, su morbimortalidad continúa siendo extremadamente elevada, con cifras de mortalidad que alcanzan el 40%. De los que sobreviven a la púrpura fulminante entre un 20 y un 60% pueden tener algún tipo de secuelas.

La importante prevalencia y gravedad de la enfermedad, así como el desconocimiento parcial de su fisiopatología, justifican el interés que tiene llevar a cabo un estudio que permita analizar las variables clínicas y epidemiológicas y, por otro lado, evaluar la existencia de asociaciones entre determinados genes y la susceptibilidad, la severidad del curso clínico o el pronóstico global de la enfermedad meningocócica, ya que además los resultados obtenidos podrían condicionar y guiar los futuros avances en la prevención y el tratamiento de esta entidad.

4. HIPÓTESIS

“Las ideas no duran mucho. Hay que hacer algo con ellas.”
(Santiago Ramón y Cajal)

La expresión clínica de la enfermedad meningocócica es amplia e incluye desde la bacteriemia y la meningitis hasta la púrpura fulminante, pasando por el shock séptico y el fracaso multiorgánico refractarios. En otras ocasiones menos frecuentes puede producir artritis, pericarditis, conjuntivitis y otitis. Las razones que explican que un paciente sea o no portador asintomático de *Neisseria Meningitidis* y, desarrolle una u otra forma clínica de la enfermedad meningocócica, pueden ser múltiples, pero creemos que la variación en la carga genética de cada individuo podría ser uno de los factores determinantes principales.

Los polimorfismos genéticos son variantes genéticas que ocurren con frecuencia en la población general; siguen patrones de herencia compleja, y, aunque habitualmente sólo tienen una influencia menor en la función o la regulación de las proteínas que determinan, podrían tener consecuencias importantes en la susceptibilidad y severidad de la enfermedad meningocócica. Consideramos que la dotación genética del individuo constituye un condicionante fundamental en la susceptibilidad, la expresividad clínica y el pronóstico global de la enfermedad meningocócica existiendo tanto, patrones genéticos predisponentes o de alto riesgo para el desarrollo de la enfermedad o de formas severas de la misma, como incluso factores genéticos protectores. El ADN mitocondrial y ciertos polimorfismos se han relacionado ya con la sepsis y el shock séptico, por lo que creemos que la enfermedad meningocócica podría tener también ahí un sustrato genético.

5. OBJETIVOS

“El científico que no sabe lo que busca no comprenderá lo que encuentra”.

(Claude Bernard)

El objetivo principal de este estudio es determinar si existe algún tipo de condicionamiento clínico, epidemiológico y/o genético en la susceptibilidad a la enfermedad meningocócica, que además nos ayude a entender el diferente comportamiento y el pronóstico de la enfermedad en términos de morbilidad y mortalidad en los diferentes individuos.

Concretamente, se confrontarán las variables clínico-epidemiológicas con los resultados del análisis del ADN mitocondrial de los individuos afectados de enfermedad meningocócica con el fin de buscar la presencia de asociación clínico-genética en:

1. La severidad del curso clínico de la enfermedad.
2. El tipo de cuadro clínico que desarrolla (meningitis, meningococemia o ambas).
3. La aparición de fracaso multiorgánico.
4. El desarrollo de secuelas.
5. La duración del ingreso hospitalario.
6. La mortalidad de la enfermedad.

Secundariamente se analizarán de manera específica las siguientes variables clínicas:

1. El tiempo transcurrido entre el inicio de los síntomas y la aparición de lesiones cutáneas.
2. La instauración de púrpura / coagulopatía (tiempo, tipo, predominio de fibrinólisis o trombosis).
3. Las características analíticas de los individuos afectados.
4. La respuesta al tratamiento antibiótico y terapias adyuvantes.
5. La necesidad de soporte hemodinámico.
6. La necesidad de soporte respiratorio.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

“Un camino de mil millas comienza con un paso”.
(Benjamín Franklin)

6.1. MATERIAL Y MÉTODOS CLÍNICOS

6.1.1. Diseño del estudio

Se llevó a cabo un estudio multicéntrico, prospectivo de casos y controles realizado a través de la red de trabajo para el Estudio sobre la Influencia Genética en la Enfermedad Meningocócica (ESIGEM - www.esigem.org). Este grupo de trabajo fue diseñado específicamente para el desarrollo del proyecto ya que la viabilidad del mismo está condicionada por la capacidad de reclutamiento de pacientes y la necesidad de un elevado número de sujetos para ejecutar adecuadamente un estudio de asociación genética. Por otro lado, sólo con una red amplia que incluya las unidades de cuidados intensivos pediátricos, se logrará la captación de los pacientes más graves, y específicamente aquellos que desarrollan formas fulminantes. Por este motivo, la red está sustentada fundamentalmente por unidades de cuidados intensivos pediátricos, bajo el auspicio de la Sociedad Española de Cuidados Intensivos Pediátricos (ver anexo).

La red ESIGEM está formada por 42 centros y más de 60 investigadores colaboradores, y abarca todo el territorio nacional. Está constituida por las principales unidades de cuidados intensivos pediátricos de la península. En todos los centros se establecieron los protocolos adecuados de actuación, desde los consentimientos éticos locales, hasta los métodos de recogida y manipulación de muestras, protocolo de recogida de datos, protocolo de envío de muestras al centro coordinador y ejecutor del proyecto (Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela). Ver anexos.

Se incluyeron todos aquellos pacientes ingresados en los distintos centros colaboradores de la red ESIGEM (ver tabla 6) por un cuadro de enfermedad meningocócica desde enero 2006 a mayo de 2008.

Red de trabajo para el estudio sobre la influencia genética en la enfermedad meningocócica (grupo de trabajo ESIGEM). Los centros están ordenados en función del código asignado para cada hospital

01	<i>Hospital Clínico Universitario (Santiago)</i>	Dr. Jose Maria Martinón Sánchez Dra. Natalia García Sánchez Dra. Nazareth Martinón Torres Dra. Fernanda Pardo Sánchez
02	<i>Hospital Universitario de Salamanca</i>	Dr. Jose Manuel Sánchez Granados Dra. Olga Serrano Ayestarán
03	<i>Hospital da Costa de Burela (Lugo)</i>	Dr. Manuel Silveira Cancela
04	<i>Complejo Hospitalario Cristal-Piñor (Ourense)</i>	Dr. Jose Luis García Rodríguez Dra. Susana María Rey García
05	<i>Hospital Parc Paulí de Sabadell</i>	Dr. Valenti Pineda Solas Dra. Teresa Gili Bagata
06	<i>Hospital Donosita de San Sebastián</i>	Dra. Cristina Calvo Monge Dra. Eider Oñate Vergara
07	<i>Hospital Ramón y Cajal de Madrid</i>	Dr. Cesar Pérez-Caballero Macarrón
08	<i>Hospital Virgen de la Salud de Toledo</i>	Dr. Jose Antonio Alonso Martín Dr. David Arjona Villanueva
09	<i>Hospital Virgen de las Nieves de Granada</i>	Dra. Pilar Azcón González de Aguilar
10	<i>Hospital Joan XXIII de Tarragona</i>	Dr. Xavier Allúe Marínez
11	<i>Hospital Universitario Central de Asturias</i>	Dr. Andrés Concha Torre
12	<i>Hospital General Universitario de Alicante</i>	Dr. Roberto Reig Saenz
13	<i>Hospital Torrecárdenas de Almería</i>	Dr. Francisco Giménez Sánchez Dr. Miguel Sánchez Forte
14	<i>Complejo Hospitalario Universitario de Vigo</i>	Dr. Alfredo Repáraz Romero Dr. Manuel Ortíz Pallares
15	<i>Complejo Hospitalario de Jaén</i>	Dr. Jesús de la Cruz Moreno Dra. M. Carmen Martínez Padilla Dra. Carmen Santiago Gutiérrez
16	<i>Hospital Infantil "La Fe" de Valencia</i>	Dr. Vicente Modesto i Alapont Dr. Rafael Gómez Zafra
17	<i>Hospital Marqués de Valdecilla de Santander</i>	Dr. Alvaro Castellanos Ortega Dr. Marcelino Pumarada
18	<i>Hospital Juan Canalejo de La Coruña</i>	Dra. Sonia Marcos Alonso Dra. Angela Ferrer Barba Dra. Ana Hurtado Doce
19	<i>Hospital Gregorio-Marañón de Madrid</i>	Dra. Amaya Bustinza Arriortua Dr. Francisco Gomez-Campderá Dra. María Luisa Navarro Gómez

20	<i>Hospital San Juan de Dios (Barcelona)</i>	Dra. Elizabeth Esteban Torné
21	<i>Hospital Vall d'Hebron (Barcelona)</i>	Dra. Sonia Cañadas Palazón
22	<i>Hospital Carlos Haya (Malaga)</i>	Dr. Jose Manuel Gonzalez Dr. David Moreno
23	<i>Hospital de Cruces (Vizcaya)</i>	Dr. Julio López Bayón Dra. Elvira Morteruel Arizkuren
24	<i>Hospital Xeral-Calde (Lugo)</i>	Dra. Soledad Martínez Regueira
25	<i>Hospital Reina Sofia (Córdoba)</i>	Dr. Juan Luis Pérez Navero
26	<i>Hospital "Virgen del Rocío"(Sevilla)</i>	Dra. María Teresa Alonso Salas
27	<i>Hospital Universitario de Albacete</i>	Dra. María del Mar Ballesteros García
28	<i>Hospital Clínico Universitario de Valencia</i>	Dr. Juan Ignacio Muñoz Bonet
29	<i>Hospital Puerta del Mar (Cádiz)</i>	Dr. Servando Pantoja Rosso
30	<i>Hospital Virgen del Camino (Navarra)</i>	Dr. Enrique Bernaola Iturbe Dra. Concepción Goñi Orayen
31	<i>Hospital Infantil "La Paz" (Madrid)</i>	Dr. Francisco Alvarado Ortega
32	<i>Hospital Virgen de La Arrixaxa (Murcia)</i>	Dra. Susana Reyes Dominguez Dra. María Cruz León León
33	<i>Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid)</i>	Dr. Juan Ignacio Sánchez Diaz Dra. Silvia Belda Hofheinz
34	<i>Hospital Rey Don Jaime (Castellón)</i>	Dra. Natalia Molini Menchón
35	<i>Hospital San Cecilio (Granada)</i>	Dra. Esther Ocete Hita
36	<i>Hospital de Monforte (Lugo)</i>	Dr. Santiago Fernández Cebrián
37	<i>Hospital Josep Trueta (Girona)</i>	Dr. Mario Sánchez Fernández
38	<i>Hospital Vixen da Xunqueira (Cee)</i>	Dra. Isabel Quintela Fernández
39	<i>Hospital 9 de Octubre (Valencia)</i>	Dr. Rafael López Peña
40	<i>Hospital de Sant Pau (Barcelona)</i>	Dr. Eduardo Carreras Gonzalez Dra. Sonia Brio Sanagustin
41	<i>Hospital Son Dureta (Palma de Mallorca)</i>	Dr. Jose Joaquin Dueñas Morales
42	<i>Hospital Arquitecto Marcide (Ferrol)</i>	Dr. Jose Luaces Gonzalez Dr. Ramon Fernández Prieto

Tabla 6. Centros colaboradores del proyecto que conforman la red multicéntrica para el estudio de la enfermedad meningocócica en la edad pediátrica

6.1.2. Tamaño muestral

Los tamaños muestrales fueron calculados de acuerdo con los criterios epidemiológicos y en base a las características de los marcadores genéticos seleccionados. También se tuvieron en cuenta los diversos modelos de prevalencia y de herencia genética que serían compatibles con la enfermedad meningocócica. De manera preliminar se consideró un mínimo de 300 casos. En cuanto a los controles, se estimó una proporción óptima caso:control 1:3. La potencia estadística se calculó usando el software Quanto²²⁷.

6.1.3. Participantes

6.1.3.1. Casos

Se consideraron candidatos a participar todos aquellos pacientes que durante el periodo de estudio ingresaron en alguno de los centros englobados en la red de trabajo ESIGEM con el diagnóstico de sospecha clínica, probabilidad o confirmación microbiológica de enfermedad meningocócica acorde a la definición validada por la Academia Americana de Pediatría²²⁸ y recogidas en el CIE-9-MC036. Se siguieron las siguientes definiciones:

- Meningitis meningocócica: cultivo positivo en LCR para *Neisseria meningitidis* y/o más de 20 leucocitos/mm³ en LCR y clínica compatible y/o hallazgos compatibles en la autopsia.
- Meningococemia: Presencia de *Neisseria Meningitidis* en sangre.
- Sospecha clínica de enfermedad meningocócica: rash purpúrico y/o petequial junto con meningitis y/o sepsis, y/o la ausencia de evidencias alternativas que justifiquen el cuadro clínico. También se considerará cualquier cuadro clínicamente compatible en el que exista la evidencia de un contacto estrecho con un caso confirmado en los 60 días previos.
- Caso probable de enfermedad meningocócica: sospecha clínica de enfermedad meningocócica junto con:
 - El hallazgo de diplococos gran negativos en sitios normalmente estériles o en aspirado/frotis de lesiones petequiales/purpúricas.
 - La presencia de antígenos de meningococo en sangre, LCR u orina.
 - Hallazgos serológicos compatibles (títulos elevados de IgM, o elevación significativa de los títulos de IgM ó IgG frente a antígenos de proteína de membrana externa de *N. meningitidis*).

- Caso confirmado de enfermedad meningocócica: aislamiento de *neisseria meningitidis* o presencia de ADN de meningococo (PCR) en un sitio normalmente estéril (sangre, LCR,...) y/o en aspirado/frotis de lesiones petequiales/purpúricas.

Se excluyeron aquellos pacientes en los que no se obtuvo el consentimiento informado para formar parte del estudio.

6.1.3.2. Controles

Se escogieron tres grupos de controles. El primer grupo (CG1) correspondía a 917 individuos españoles empleados por la unidad de Medicina Xenómica del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela previamente en un estudio de cáncer de mama. El segundo grupo (CG2), de 616 individuos, genotipados de novo y el tercer grupo (CG3) de 597 sujetos, extraído de las Islas Canarias empleado para el contraste de hipótesis adicionales. Posteriormente se estandarizó por sexo y grupo poblacional para su comparación.

6.1.4. Intervención

En todos los participantes, se obtuvo por escrito un consentimiento informado, se aplicó un protocolo de recogida de datos demográficos, clínicos, analíticos y evolutivos (ver anexo) y se extrajo una muestra de sangre de 2 ml (en medio con EDTA) para posteriormente obtener del ADN mitocondrial.

6.1.5. Aprobaciones éticas

El estudio fue aprobado por el CEIC de referencia (Comité Ético de Investigación de Galicia) y el CEIC de la Universidad de Santiago (Ver anexo I) y posteriormente por todos los comités de ética locales de los diferentes centros participantes y la sociedad española de cuidados intensivos pediátricos.

La información difundida y obtenida a través de los sujetos del estudio es considerada confidencial y fue tratada en todo momento como tal. Los sujetos del estudio fueron identificados con un código que protegía su identidad de manera que en caso de publicación de los resultados del estudio no se reveló ni se revelará la identidad de los pacientes.

El trabajo se llevó a cabo de acuerdo a las recomendaciones para estudios con seres humanos que figuran en la Declaración de Helsinki de 1964 revisada por última vez en Seúl en 2008²²⁹.

6.1.6. Variables del estudio

Se recogieron 204 variables en cada paciente (ver anexo), las cuales se agruparon categóricamente de la siguiente forma:

6.1.6.1. Variables primarias:

- Diagnóstico al ingreso
- Supervivencia al alta
- Severidad de afectación (escalas clínicas Meningococcal Septic Shock Score y Pediatric Risk of Mortality Score)
- Incidencia de secuelas
- Capacidad funcional al alta (Glasgow y Pediatric overall performance category)

6.1.6.2. Variables secundarias:

- Raza
- Sexo
- Edad
- Localidad de origen del individuo, sus padres y sus abuelos
- Antecedentes personales y familiares de enfermedad
- Estado de vacunación
- Necesidad de ingreso en UCIP
- Extensión de púrpura
- Dosis máxima de aminas
- Volumen de líquidos infundidos
- Número de órganos afectados
- Necesidad de intubación endotraqueal y soporte ventilatorio
- Necesidad de transfusión con hemoderivados
- Duración del ingreso hospitalario
- Cambios en la escala de gravedad
- Glasgow
- Parámetros hematológicos
- Parámetros bioquímicos
- Parámetros de coagulación
- Datos microbiológicos

6.2. METODOLOGÍA DE LABORATORIO

6.2.1. Elección del método de genotipado

En general, los métodos de genotipado de SNPs pueden clasificarse en función de la reacción de discriminación alélica utilizada, del método de detección de los resultados y del formato del estudio. De ese modo un producto de una reacción puede detectarse mediante más de un método, y un método de detección puede utilizarse para detectar productos de distintas reacciones.

A la hora de elegir un método u otro de genotipado debemos tener en cuenta tanto el número de SNPs que queremos tipar, el número de muestras a analizar, la capacidad de análisis de múltiples SNPs de modo simultáneo, la cantidad de ADN que tengamos, el tipo de reacción de discriminación alélica, y el método de detección a utilizar.

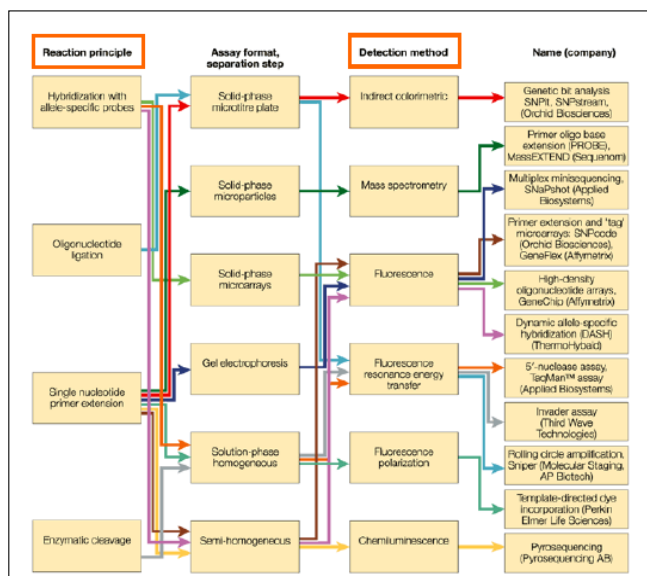


Figura 15. Tecnologías de genotipado. Adaptado de Syvanen 2001.

La elección del uso del kit comercial SNaPshot® se tomó en base a los siguientes criterios:

- Las técnicas de genotipado *multiplex* previenen errores que pudieran surgir debido a mezcla de muestras (*sample mix-up*) y contaminación. Estos errores surgen fundamentalmente cuando una misma muestra es analizada de manera independiente (vía PCR) para distintos marcadores moleculares (ej. HVR-I y HVR-II o diferentes SNPs)^{230,231}.
- La técnica de minisecuenciación implementada en SNaPshot es adecuada para el genotipado simultáneo de SNPs en *multiplexes*. Entre sus múltiples ventajas respecto a otras técnicas clásicas (ej. RFLP) están su bajo coste, la rapidez del genotipado, y la reproducibilidad de los resultados así como la tasa de éxito (*call rate*) por SNP tipado.

6.2.2. Extracción de ADN y su cuantificación

El ADNmt se obtuvo a partir de linfocitos de sangre periférica conservada en EDTA. Este ADN se extrajo mediante el kit Wizard® Genomic (Promega Corporation, Madison, WI), el cual consta de tres pasos. En primer lugar se realiza una lisis celular que rompe las membranas plasmática y nuclear con el fin de aislar el ADN de la serie blanca. Durante la segunda fase se eliminan las proteínas mediante precipitación con sales, de modo que el ADN queda en suspensión. En el tercer paso se concentra el ADN y se eliminan las sales de la suspensión precipitando con isopropanol.

Tras la extracción del ADN se procede a cuantificar su concentración mediante Nanodrop ND-1000, el cual determina la concentración de ADN mediante espectrofotometría.

Debido al alto rendimiento de la extracción, la mayor parte de las muestras contiene una concentración de ADN superior a 150 µg/ml, éstas se diluyeron en agua miliQ obteniéndose de ese modo una concentración final de 50 µg/ml.

6.2.3. Amplificación

Los SNPs genotipados están basados en los descritos por Quintáns et al ²³². En su artículo describen un multiplex diseñado para 17 SNPs capaz de distinguir los distintos haplogrupos que definen el árbol filogenético de la figura 16.

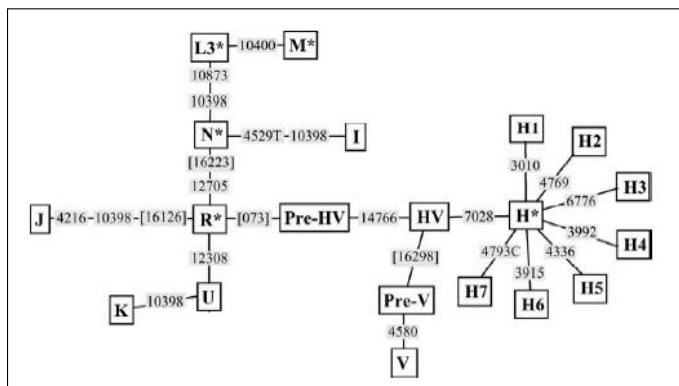


Figura 16. Árbol filogenético definido por 17 SNPs. Adaptado de Quintans y cols.

Se diseñaron veinte pares de *primers* para amplificar regiones del ADNmt que contienen de uno a tres SNPs de interés, de modo que esta región amplificada sirva luego de molde para las sondas empleadas en la minisequenciación.

Los *primers* utilizados en la amplificación, y las sondas de la minisequenciación, se diseñaron en base a su temperatura de hibridación, a los alelos de los distintos SNPs, y a la longitud del amplicón resultante de la reacción de minisequenciación, de modo que la temperatura de hibridación tanto de los *primers* como de las sondas de un mismo *multiplex* sean similares, y que el tamaño de las sondas, junto con la variante presente, nos permitan discernir un SNP u otro en el electroferograma resultante.

Partiendo de los SNPs tipados por dicho *multiplex*, se incluyeron ocho nuevos SNPs a tipar de modo que los *primers* y sondas a utilizar se distribuyeron en dos *multiplexes*, uno que engloba 19 SNPs y un segundo *multiplex* que agrupa 6 SNPs (Fig 37).

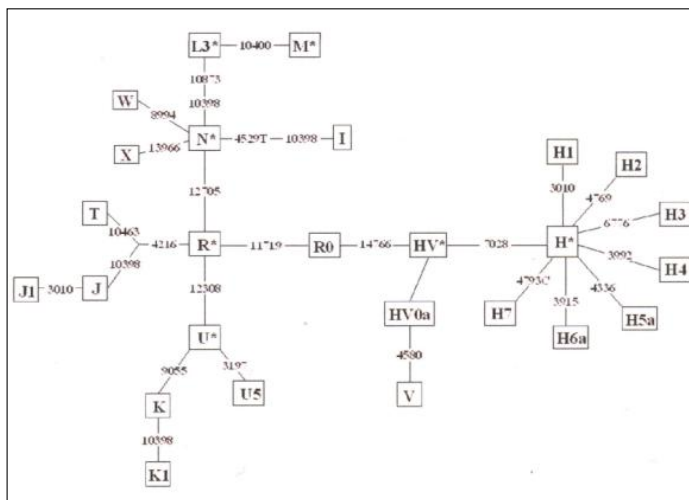


Figura 17. Árbol filogenético obtenido del genotipado de los 25 SNPs.

Cada uno de los *multiplexes* de *primers* requirió de un protocolo de amplificación distinto:

- *Multiplex* 1:
 - 1 μ l del mix de *primers* 1
 - 5 μ l de agua
 - 1 μ l de ADN

- *Multiplex* 2:
 - 0,16 μ l de Taq Gold (*Aplied Biosystems, Foster City, CA*).
 - 1 μ l de buffer (*Aplied Biosystems, Foster City, CA*).
 - 1,5 μ l MgCl₂ (*Aplied Biosystems, Foster City, CA*).
 - 0,7 μ l de dNTPs
 - 3,64 μ l de agua
 - 2 μ l del *mix* de *primers* 2

El volumen final de ambas reacciones fue de 10 μ l. Se sometieron a una preincubación de 95°C durante 15 minutos seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 58°C durante 1,5 minutos y extensión a 72°C durante 1,5 minutos, con una extensión final durante 10 minutos a 72°C.

6.2.4. Comprobación de los resultados

Tras la amplificación se llevó a cabo una comprobación de los resultados mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida con tinción de plata.

6.2.5. Purificación

Una vez comprobados los resultados se adicionaron 0,5 μ l del reactivo ExoSAP-IT (Amersham Pharmacia Biotech) a 1 μ l del producto amplificado, con el fin de

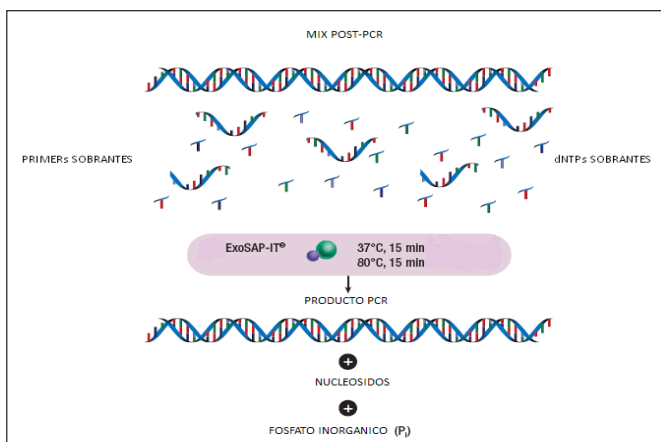


Figura 18. Purificación enzimática.

eliminar los *primers* y los deoxinucleótidos no incorporados, y se sometió a 37°C durante 15 minutos seguido de otra fase a 80°C durante 15 minutos para inactivar la enzima. Ver figura 18.

El reactivo ExoSAP-IT contiene dos hidrolasas, una fosfatasa alcalina que cataliza la liberación de los grupos fosfato, por ello se puede utilizar para degradar los dNTPs no incorporados tras la PCR; y una exonucleasa I, que elimina los oligonucleótidos no hibridados.

6.2.6. Minisequenciación

Para llevar a cabo la minisequenciación se utilizan sondas, que son oligonucleótidos que amplifican la secuencia inmediatamente anterior al SNP de interés. De ese modo, en función del ddNTP marcado fluorescentemente incorporado, y a la longitud de la sonda, podremos determinar qué alelo está presente.

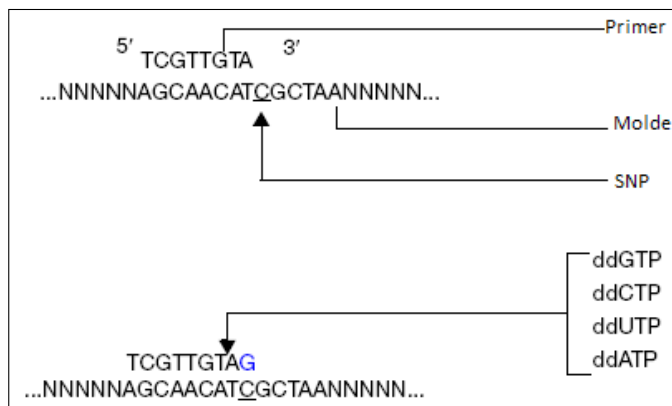


Figura 19. Esquema de la minisequenciación.

Para realizar la reacción de minisequenciación se llevaron a cabo dos protocolos distintos para cada uno de los *multiplexes*:

- **Multiplex 1:**
 - 1,5 µl de Kit SNaPshot® (*Aplied Biosystems, Foster City, CA*)
 - 0,5 µl de mix de sondas
 - 1,5 µl de agua
 - 1,5 µl de muestra

- **Multiplex 2:**
 - 1 µl de Kit SNaPshot® (*Aplied Biosystems, Foster City, CA*)
 - 0,5 µl de mix de sondas
 - 2 µl de agua
 - 1,5 µl de muestra

El volumen resultante de ambas reacciones, que fue de 5 µl, se sometió a 25 ciclos consistentes en una desnaturalización a 96°C durante 10 segundos seguido de una fase de hibridación a 50°C durante 5 segundos y una extensión a 60°C durante 30 segundos.

6.2.7. Purificación de los productos de secuenciación

Los dideoxinucleótidos fluorescentes restantes se inactivaron mediante la adición de 0,5µl de fosfatasa alcalina, SAP (*Amersham Biosciences*) al volumen

resultante de la reacción de minisequenciación, 5µl, y se incubó a 37°C durante 60 minutos seguido de 15 minutos a 85°C.

6.2.8. Genotipado

Se obtuvo 1 µl de la mezcla resultante y se añadieron 9,52 µl de Formamida Hi-Di™ (*Aplied Biosystems, Foster City, CA*) junto con 0,48 µl del marcador interno LIZ-120 (*Aplied Biosystem, Foster City, CA*).

Las sondas marcadas fluorescentemente fueron separadas mediante electroforesis capilar en un secuenciador ABI PRISM 3130 (*Aplied Biosystems, Foster City, CA*) en el polímero POP-6™ (*Aplied Biosystem, Foster City, CA*).

Los datos se procesaron utilizando el software GeneMapper® v4.0 (*AB, Aplied Biosystem, Foster City, CA*)

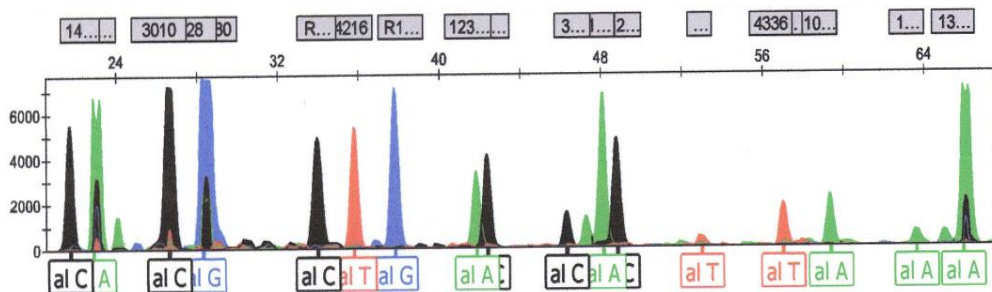


Fig 20: Multiplex EU1

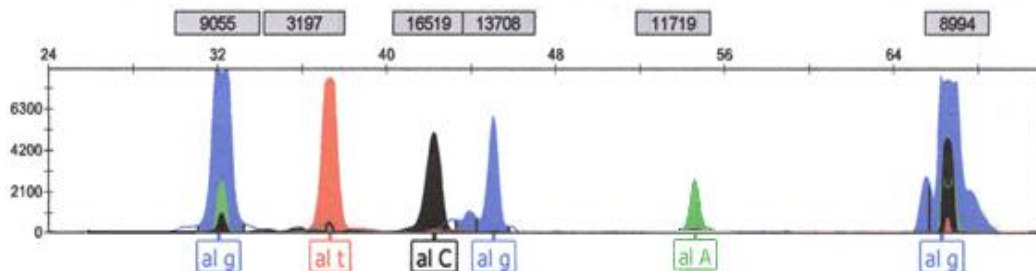


Figura 21. Multiplex EU2.

6.2.9. Análisis estadístico

Para cada SNP estudiado se realizó una prueba de Chi-cuadrado de Pearson con la corrección de Yates para detectar asociación de dichas variantes entre la población de casos y la población de controles.

Cuando se obtuvo un valor de significancia (p) por debajo de un umbral preestablecido (generalmente $\alpha = 0.05$ ó $\alpha = 0.01$) se asume que hay evidencias de que ese SNPs está asociado con la enfermedad. El problema es que cuando se estudian varios marcadores, la probabilidad de que alguno aparezca como “estadísticamente” asociado solamente por azar incrementa; en promedio, uno de cada 20 SNPs estudiados aparecerá como estadísticamente asociado solamente por azar (para $\alpha = 0.05$). La mayor parte de los estudios de asociación caso-control en relación al estudio del ADN mitocondrial como factor de riesgo en una enfermedad compleja, no utilizan correcciones estadísticas para test múltiples. Esto hace que la mayor parte de las asociaciones no puedan ser replicadas en estudios independientes.

Para ajustar por test múltiple, se pueden utilizar diferentes pruebas estadísticas. Por un lado, el test de Bonferroni. En el caso del genoma mitocondrial es excesivamente conservador debido a que existe un fuerte desequilibrio de ligamiento entre las variantes ya que se trata de un marcador puramente haplotípico. Si bien este desequilibrio se puede diluir para variantes características de los distintos extremos de las ramificaciones filogenéticas (*tips*), la asociación permanece con cada uno de los SNPs que preceden en la filogenia.

El segundo test para ajustar por hipótesis múltiple es el desarrollado por Benjamini y Hochberg ²³³ para el control del *False Discovery Rate* a un nivel predeterminado del nivel de significancia α (ej. 0.05). Este método consiste en los siguientes pasos:

- Para cada test m , se ordenan los valores P en orden ascendente $P(1) \leq P(2) \leq \dots \leq P(m)$.
- Si se denota como $H(i)$ la hipótesis nula correspondiente a $P(i)$; sea k el valor más grande de i para el cual se cumple la siguiente condición:

$$P_{(i)} \leq \frac{\alpha}{m} i$$

- finalmente se rechazan todas las hipótesis nulas $H_{(1)} \dots H_{(k)}$.

Uno de las pruebas estadísticas más comúnmente empleadas en estudios caso-control para corregir por hipótesis múltiple es el basado en la teoría de permutación. En este caso concreto, dadas las características del ADN mitocondrial, el test de permutación parece ser el más adecuado, ya que de manera indirecta pondera la compleja relación que existe entre las variantes mitocondriales (desequilibrio de ligamiento); por ejemplo, un test de permutación sobre variantes que no presenten desequilibrio de ligamiento se aproximaría a un test de Bonferroni. Como veremos en los resultados y en las conclusiones, existe un buen candidato asociado con la enfermedad, por lo que la posibilidad de falsos negativos usando permutación se puede ignorar en este caso una vez detectado este mejor SNP candidato. El test básicamente permuta las etiquetas de casos y controles en 100.000 *runs*, para un test exacto de Fisher, seleccionando los mejores valores de P (P -valor). Finalmente, se calcula el porcentaje de valores de P permutados que caen por debajo del valor original. Este porcentaje, sobre el total de las permutaciones, es el valor de P ajustado.

6.2.10. Análisis filogenético

La selección de los SNPs genotipados en el presente estudio se ha basado en criterios estrictamente filogenéticos. Se construye un *network*, el cual equivale a un árbol de máxima parsimonia que considera todas las alternativas filogenéticas posibles, de manera que en una situación normal se detectan reticulaciones topológicamente complejas. En una situación ideal, si no existe homoplasia, el *network* es un árbol típico de parsimonia.

Los SNPs seleccionados son fundamentalmente aquellos que diagnostican haplogrupos conocidos en poblaciones Euroasiáticas y por lo tanto tienen una tasa de mutación baja. Esto hace que en la práctica, la filogenia real se aproxima a un árbol sin reticulaciones. Los resultados *a posteriori* reflejan este hecho, si bien, tal y como se describirá en los resultados, existen ciertas inconsistencias filogenéticas que corresponden a eventos mutacionales reversos en algunos perfiles concretos.

6.3. ANÁLISIS GENÉTICO

Para el análisis genético se emplearon 2.126 controles los cuales procedían de tres grupos diferentes. Se realizó previamente una estandarización por grupo poblacional. El primer grupo control (CG1) correspondía a 917 individuos españoles, los cuales habían sido empleados previamente en estudios de casos y controles de cáncer de mama¹⁸; a su vez, un subgrupo de éste fue previamente sometido a estratificación poblacional utilizando para ello el panel de SNPs autosómicos neutrales. El segundo grupo control (CG2) correspondía a 616 individuos españoles genotipados de novo. Además, para la realización de test adicionales de hipótesis se empleó un tercer grupo control (CG3) compuesto por 797 individuos procedentes de las Islas Canarias y extraídos de un trabajo de casos y controles de cancer de mama. Tanto el genotipado de los casos como el de los controles fue testado por dos analistas independientes con el fin de minimizar la probabilidad de errores de genotipado. Los resultados ambiguos fueron eliminados del análisis.

6.3.1. Selección del ADNmt

Se analizó el genotipo de 25 SNPs-mt incluyendo los haplogrupos europeos más frecuentes como H, U, K, etc. El panel completo de SNPmt genotipados fueron los utilizados en el trabajo de Mosquera y cols²³⁴.

6.3.2. Test de Ancestralidad

Un panel de 34 AIMS (Ancestry Informative Markers) autosómicos fueron empleados para verificar la ancestralidad en el grupo de los casos y en el CG2. Se encontró una alta diversificación en la distribución de alelos entre los principales grupos poblacionales. La asignación de un grupo poblacional africano, americano nativo, y europeo a cada uno de los sujetos de estudio fue comprobado añadiendo un sub-set de muestras extraídas del panel del CEPH (Centre d'Etude du Polymorphisme Humain; <http://www.cephb.fr/>) así como de muestras adicionales del proyecto *SNPforID* (Phillips); todas ellas fueron también genotipadas con el mismo panel de 34-plex. Estas muestras representan las tres principales fuentes ancestrales de población que han contribuido a la composición genética de la población española

(considerando la reciente existencia de inmigrantes procedentes fundamentalmente de África y América) y en particular a nuestra muestra de pacientes con EM. Los genotipos fueron conseguidos a través del buscador *SNPforID* (<http://spsmart.cesga.es/snpforid.php>). The final sets of samples used for the inference of individual ancestry were as follows: Africa ($N = 225$), including Biaka Pygmy (Central African Republic; $N = 23$), Mbuti Pygmy (Democratic Republic of Congo; $N = 13$), Bantu-speakers from Kenya ($N = 11$), Mozambique ($N = 60$), San (Namibia; $N = 6$), Yoruba (Nigeria; $N = 22$), Mandenka (Senegal; $N = 22$), Somalia ($N = 60$), South African Bantu ($N = 8$); America ($N = 208$), including Karitiana (Brazil; $N = 14$), Surui (Brazil; $N = 8$), Awa (Colombia; $N = 38$), CEPH-Colombians ($N = 7$), Coiyama (Colombia; $N = 71$), Pijao (Colombia; $N = 35$), Maya (Mexico, $N = 21$), Pima (Mexico, $N = 14$); and Europe ($N = 278$), including Denmark ($N = 60$), French-Basques (France, $N = 24$), France ($N = 28$), Sardinia (Italy, $N = 28$), Tuscany (Italy, $N = 8$), Bergamo (Italy; $N = 13$), Galicians (North West Spain; $N = 60$), Orkney Islands (Scotland; $N = 15$), Russia ($N = 25$), Adygei (Russia Caucasus; $N = 17$).

El software STRUCTURE v.2.3.1 (Pritchard JK) fue utilizado para estimar la proporción de ancestralidad inferida de los individuos en los grupos europeo, Americano y africano. Esta información fue empleada para monitorizar el efecto de la estratificación de la población mediante test de asociación. Cada iteración (run) consistió en 200,000 cadenas de Markov, incluyendo un calibrado (“burn-in”) que incluyó 200,000 iteraciones y cinco replicas. Se asumieron valores de K entre 2 y 6; siendo K el número de grupos a los que asignar porcentajes de ancestralidad (“ancestral membership”). La probability a posteriori fue de (virtualmente) 1 para $K = 3$. La variabilidad de los AIMs fue también analizada por el método del análisis del principal componente. Se empleó una versión modificada de la *R library SNPassoc* para los SNP tri-alélicos.

6.3.3. Genotipado por minisequenciación

Todas las muestras fueron genotipadas de acuerdo con los protocolos descritos anteriormente para los SNPmt²³⁵ y para los AIM. En ambos casos los métodos de genotipado fueron basados en la minisequenciación SnaPshot. Se comprobaron los haplotipos de ADNmt usando una aproximación filogenética con el fin de reducir la probabilidad de error de genotipado^{216,218}.

6.3.4. Test de asociación de los diferentes SNPmt con las variables clínicas

Si bien se recogieron más de 200 variables clínicas, en la comparación de las variables clínicas con los resultados genéticos y con el fin de minimizar el número de hipótesis testadas, se seleccionaron las siguientes: (1) Datos clínicos: diagnóstico, estado de vacunación, tiempo transcurrido desde la aparición de síntomas hasta el ingreso, tiempo de estancia hospitalaria y en la unidad de cuidados intensivos pediátricos, mortalidad, morbilidad, tratamiento, escalas de riesgo de mortalidad (PRISM, MSSS), (2) Datos microbiológicos: serogrupo, serotipo y lugar de aislamiento y (3) Datos de laboratorio: leucocitos, hematíes, plaquetas, glucosa, creatinina, sodio, pH, PaO₂/FiO₂, calcio, test de coagulación y procalcitonina.

Las asociaciones se realizaron de manera individual para los diferentes SNP comparando las diferentes frecuencias alélicas entre los casos y los controles (para dos de los grupos de controles de manera separada, CG1 y CG2) y utilizando el test de Chi-cuadrado con un grado de libertad, o el test exacto de Fisher para frecuencias menores a 5. Asimismo, se utilizó el test de permutación para reducir los errores derivados de las comparaciones múltiples en los test de asociación con SNPmt. El incondicional de regresión logística se empleó para modular el efecto de los haplogrupos frente a las variables clínicas, así como el efecto de estas variables sobre la ancestralidad de los pacientes. Para comprobar la asociación de la variable clínica se llevó a cabo el test de regresión logística multinomial.

6.4. MATERIAL Y MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Para realizar el análisis estadístico de los datos genéticos se empleó el paquete estadístico Stata v.8 (<http://www.stata.com/>) y R (<http://www.r-project.org/>). La potencia de los cálculos realizados fue comprobada mediante el programa Quanto (gaderman), así como todos los algoritmos disponibles. Dicha potencia es computada bajo los principios alélicos que no necesariamente cumplen las condiciones específicas de las variantes del ADNmt. No obstante, existe otra opción disponible diseñada específicamente para computar la potencia los estudios de ADNmt de casos y controles.

El análisis descriptivo de las muestras así como de las variables clínicas se llevó a cabo mediante el paquete estadístico SPSS 15.0. Los datos descriptivos se expresan como media (desviación estándar). Se consideró significativa una $p < 0.05$. La recogida de datos de cada paciente se realizó mediante un formulario de Word, que posteriormente se volcó en una base de datos Access (Microsoft Office 2003®). El procesamiento estadístico de los datos se realizó con el paquete de software estadístico SPSS 16.0 (Illinois, etc).

7. RESULTADOS

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa”.

(Mahatma Gandhi)

**BLOQUE I: ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS
PACIENTES AFECTOS DE ENFERMEDAD
MENINGOCÓCICA**

7.1. CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA

7.1.1. Características demográficas de la muestra

Durante el período comprendido entre octubre de 2005 y noviembre de 2009 se incluyeron en el estudio un total de 366 niños con enfermedad meningocócica a través de la red multicéntrica ESIGEM habiendo descartado previamente 3 casos por ausencia de documento de consentimiento informado, 4 por muestra sanguínea inadecuada o en mal estado y 5 por falta del protocolo de registro de datos cumplimentado.

Los datos demográficos de la cohorte de casos se recogen en la tabla 7. De las 366 muestras analizadas, 203 (55,3%) fueron varones, y 125 (34,1%) mujeres y en 39 casos no se especificaba el género. La proporción varones:mujeres fue 1,6:1. La edad media fue 3.7 (3.9) años con un rango de 0,02-29,55 años. En cuanto al mes en el que se produjo la enfermedad se encontró la siguiente distribución: enero 44 (12%) casos, febrero 40 (10,9%), marzo 46 (12,5%), abril 29 (8%), mayo 25 (6,8%), junio 15 (4,1%), julio 17 (4,6%), agosto 9 (2,5%), septiembre 11 (3%), octubre 22 (6%), noviembre 25 (6,8%), diciembre 22 (6%) casos (ver figura 22).

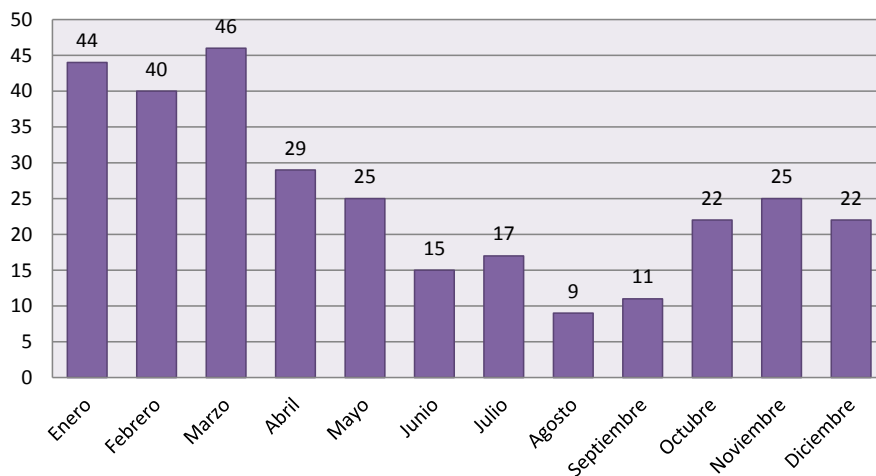


Figura 22. Número de casos enfermedad meningocócica según mes.

La distribución de pacientes por Comunidad Autónoma donde fueron reclutados se refleja en la Figura 23: Galicia 71 (19,4%), País Vasco 84 (22.9%), Cataluña 49 (13.3%), Andalucía 46 (12.56%), Cantabria 34 (9.3%), Madrid 23 (6.3%), Asturias 19 (6.2%), Castilla La Mancha 13 (3.5%), Castilla León 11 (3%), Valencia 4 (1.1%), Extremadura 1 (0.2%), Canarias 1 (0.3%), Navarra 3 (0.8%), Murcia 3 (0.8%).

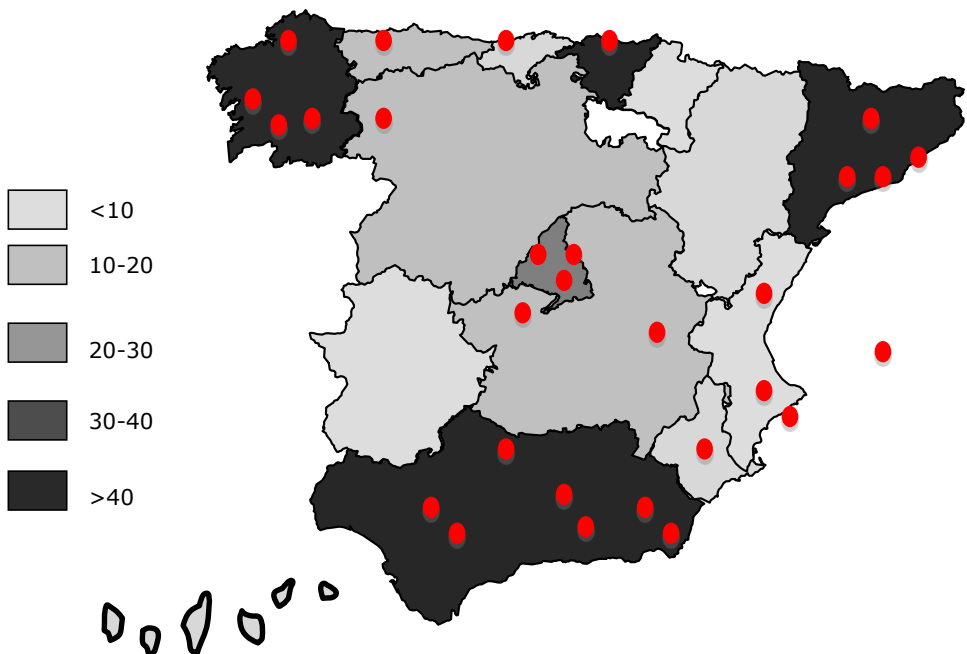


Figura 23. Distribución de los casos de enfermedad meningocócica por centros colaboradores.

La distribución de pacientes en función de su estatus socioeconómico fue: 184 (80,34%) de nivel socioeconómico medio, 32 (13,97%) pacientes eran de nivel socioeconómico bajo, 13 (5,67%) de nivel socioeconómico alto. En 88 casos no se especificó este campo.

Características demográficas	N (promedio)
Total de la muestra	366
Sexo	203 (55.3%) Varones 125 (34%) Mujeres
Edad	3,6 (4,29)
Comunidad autónoma	47 (21.7%) Galicia 30 (13.8%) Cantabria 29 (13.4%) País Vasco 29 (13.4%) Cataluña 27 (12.5%) Andalucía 18 (8.3%) Madrid 13 (6%) Castilla La Mancha 10 (4.62%) Asturias 3 (1.3%) Valencia 2 (0.9%) Castilla León 1 (0.4%) Extremadura 1 (0.4%) Baleares 1 (0.46%) Navarra
Grupo poblacional	184 (85,2%) Europeo occidental 14 (6,5%) Etnia gitana 7 (3,2%) Norteafricano 5 (2,3%) América Central 4 (1,9%) América Sur 1 (0,5%) África-subsahariana
Nivel socioeconómico	7 (3,2%) Alto 153 (70%) Medio 25 (11,6%) Bajo

Tabla 7. Características demográficas de los pacientes afectados de enfermedad meningocócica.

En cuanto al grupo poblacional, 316 (86.1%) pacientes eran europeos occidentales, 23 (6.3%) de etnia gitana, 11 (3%) norte-africanos, 5 (1.4%) de América central, 8 (2.2%) de América del sur, 1 (0,3%) paciente era de origen africano-subsahariano.

7.1.2. Antecedentes familiares y personales de interés

En la anamnesis 38 (17,6%) pacientes presentaba antecedentes familiares de interés (ver Tabla 8). En 23 (6,3%) casos se refirió antecedente de enfermedad meningocócica mientras que en 35 (9,5%) casos se registró antecedente de meningitis. Cinco (1,85%) pacientes tenían antecedente de inmunodeficiencia: dos de ellos eran hijos de madres VIH positivo, otros dos eran nietos de abuelos VIH positivo y uno de éstos tenía antecedente de síndrome de Larsen. Once pacientes refirieron antecedente de enfermedad hereditaria (1 enfermedad de Von Willebrand, 1 Talasemia, 1 Poliquistosis renal, 1 enfermedad de Stargardt, 1 enfermedad neuromuscular, 1 corea de Huntington, 1 DM-2 abuela materna, 1 talasemia menor en madre y hermano, 1 hipercolesterolemia, 1 traslocación cromosómica (ver tabla 8).

Antecedentes familiares	38 (17,6%)
Enfermedad meningocócica	23 (6,3%)
Meningitis	35 (9,5%)
Inmunodeficiencia (VIH)	5 (1,4%)
Enfermedad hereditaria:	11 (3,5%)
• Von Willebrand	1
• Talasemia	2
• Poliquistosis renal	1
• Enfermedad de Stargardt	1
• Enfermedad neuromuscular	1
• Corea de Huntington	1
• DM-2	1
• Enfermedad de Bater	1
• Hipercolestolemia	1
• Traslocación cromosómica	1

Tabla 8. Antecedentes familiares de los pacientes afectos de enfermedad meningocócica.

Se recogieron antecedentes personales en 27 casos (7,3%). Un paciente (3,8%) había tenido meningitis previamente, 15 (57,7%) habían presentado infección grave,

5 (19,2%) tenían antecedente de inmunodeficiencia (1 hiperplasia suprarrenal congénita, 2 hijos de madres VIH y hepatitis C positivos, 1 vitiligo versus mosaicismo y 2 pacientes recibían tratamiento inmunosupresor, 1 de ellos hidrocortisona y fludrocortisona y en el otro se desconocía (ver tabla 9).

Antecedentes personales	27 (7,3%)
Meningitis	1 (3,8%)
Infección grave	15 (57,7%)
Inmunodeficiencia	5 (19,2%)
• Hiperplasia suprarrenal congénita	1 (3,8%)
• VIH	1 (3,8%)
• Hepatitis C	1 (3,8%)
• Vitiligo	1 (3,8%)
• Tratamiento inmunosupresor	2 (7,7%)

Tabla 9. Antecedentes personales de los niños afectos de enfermedad meningocócica.

7.1.3. Estado vacunal de los pacientes incluidos en el estudio

En relación al estado vacunal frente al meningococo, 248 (67,75%) de nuestros pacientes recibieron algún tipo de inmunización: 221 (89,11%) recibieron la vacuna conjugada frente al meningococo C, y 27 (10,88%) la polisacárida combinada con A. De los 366 pacientes, 40 (10,92%) no estaban vacunados frente al meningococo. En 79 (21,58%) no constaba el estado de vacunación. Ver diagrama de flujo en la figura 23.

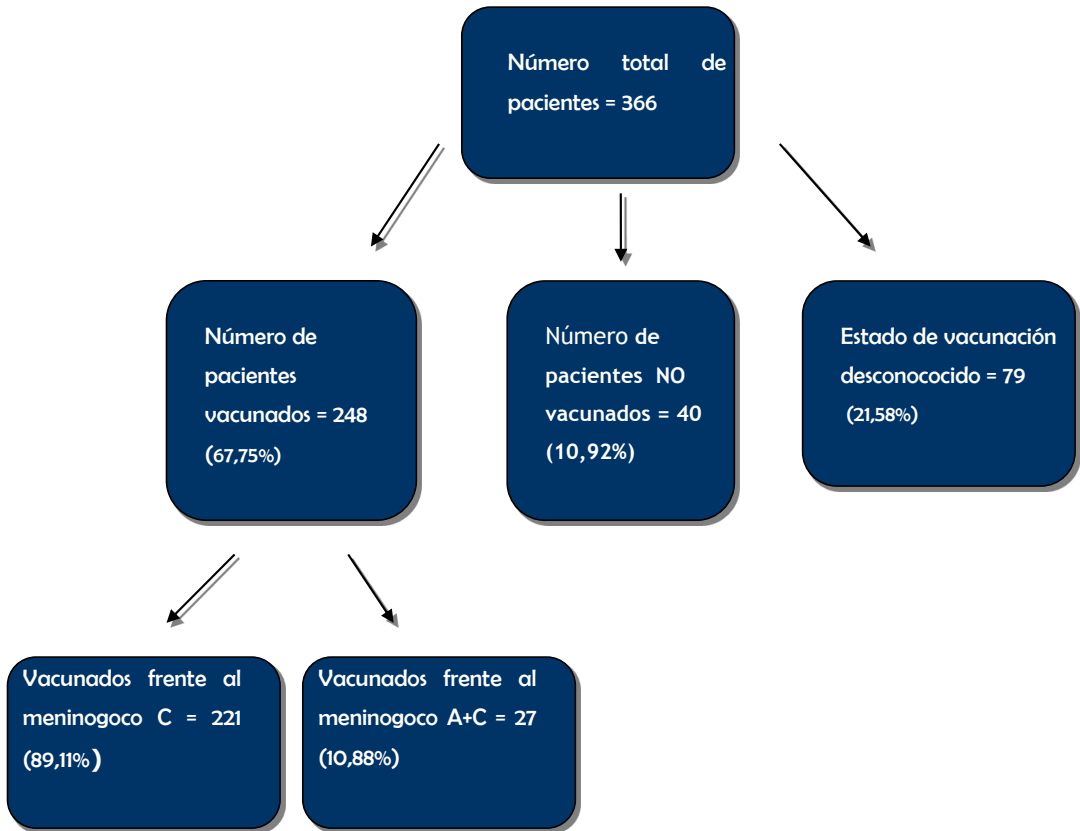


Figura 23. Representación esquemática del estado de vacunación de los pacientes afectados de enfermedad meningocócica.

7.1.4. Características clínicas y evolutivas

En nuestra serie de 366 pacientes, 22 (6%) estaban recibiendo antibióticos previamente a ser diagnosticados de enfermedad meningocócica. En cuanto al tipo de antibiótico que recibían, 6 tomaban amoxicilina, 4 amoxicilina-clavulánico, 4 cefuroxima, 3 azitromicina, 1 cefaclor, 1 cefotaxima, 1 ceftriaxona.

El diagnóstico de entrada fue de sepsis meningocócica en 225 (47,4%), meningitis meningocócica en 67 (14,1%) y sepsis meningocócica acompañada de meningitis en 183 (38,5%). En cuanto a la gravedad del cuadro clínico al ingreso 35

pacientes (9,5%) presentaban sepsis grave y 95 casos (25,9%) shock séptico. Cuando se consideraron únicamente los casos de enfermedad meningocócica confirmada (n=233; 63,66% del total de muestras), la distribución de la forma clínica de presentación fue de sepsis en 126 (54,07%), sepsis grave en 24 (10,3%) y shock séptico en 83 (35,62%). La proporción de shock séptico fue similar en el grupo de pacientes con diagnóstico de sepsis que en el grupo de sepsis con meningitis. Presentaban, además, meningitis meningocócica 136 (58,36%) pacientes; en 30 (12,87%) casos no se realizó análisis de LCR.

Desde el punto de vista evolutivo, el tiempo medio transcurrido desde el inicio de los síntomas hasta el ingreso en la muestra global fue de 11 (7,4) horas, con un rango de 45 minutos a 144 horas (ver figura 24). Paralelamente, el tiempo medio de evolución desde la aparición de las primeras lesiones cutáneas hasta el ingreso fue de 5,49 (5,42) horas con una mediana de 2 horas (ver figura 25). No obstante, el tiempo medio desde el inicio de los síntomas hasta el ingreso fue significativamente mayor ($p < 0.001$) en aquellos pacientes que sólo presentaron meningitis en los que fue de 30 (22,1) horas con una media de 24 horas. Lo mismo se observó en el tiempo de aparición de las lesiones petequiales siendo también significativamente mayor en los pacientes que sólo presentaron meningitis en los que fue de 7,17 (6,34) horas con una mediana de 6 horas.

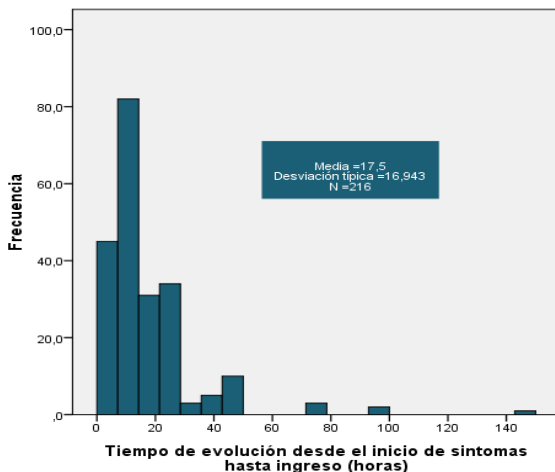


Figura 24. Tiempo de evolución en horas desde la aparición de los primeros síntomas hasta el ingreso del paciente.

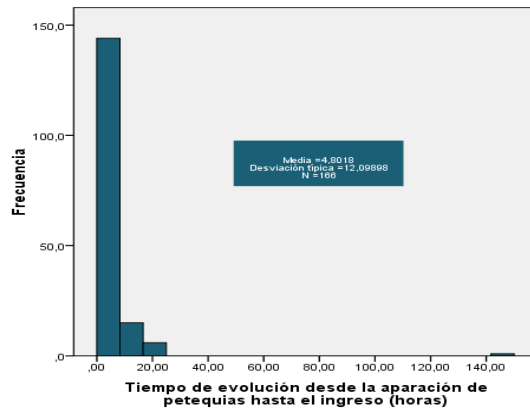


Figura 25. Tiempo de evolución desde la aparición de las petequias hasta el ingreso.

Del total de pacientes, 273 (74,4%) ingresaron en una UCIP, mientras el resto ingresaron directamente en una planta de hospitalización. El tiempo medio de estancia en UCIP fue de 3,87 (6,07) días, con una mediana de 2 días y un máximo de 48 días. Por otro lado, el tiempo medio de estancia hospitalaria global fue de 11,88 (12,88), con un máximo de 135 días. En la tabla 10 se recogen los tiempos de estancia medios según el diagnóstico.

Diagnóstico clínico	Tiempo medio (DS) de estancia en UCIP	Tiempo medio (DS) de ingreso hospitalario
Sepsis	1,76 (1,75)	9,35 (4,84)
Sepsis grave	2,88 (2,12)	8,32 (2,43)
Shock séptico	8,27 (9,3)	11,99 (20,88)

Tabla 10. Tiempos medios de estancia en UCIP y estancia hospitalaria según diagnósticos clínicos.

Cuando se compararon los tiempo medios de estancia en UCIP entre los pacientes que presentaron meningitis frente a los que no la presentaron se observó un aumento significativo de éste entre los pacientes que no presentaron meningitis, 6,14 (8,53) frente a 3,62 (5,24) respectivamente con un valor de $p=0,04$.

Las escalas de valoración que se utilizaron fueron la PRISM para el riesgo de mortalidad en el paciente pediátrico y la MSSS específica de enfermedad meningocócica. El promedio de puntos según la escala de PRISM fue de 9,44 (12,48) y el de la escala MSSS fue de 1,38 (2,23). Teniendo en cuenta el diagnóstico clínico al ingreso las escalas PRISM y MSSS reflejaron el estado de gravedad del paciente según se recoge en la tabla 11.

Diagnóstico clínico	PRISM	MSSS
Sepsis	3,33 (3,64)	0,28 (0,64)
Sepsis grave	7,24 (3,7)	1,32 (1,82)
Shock séptico	21,9 (15,92)	3,53 (2,75)

Tabla 11. Valores de PRISM y MSSS según diagnóstico clínico.

Se valoró el grado de afectación por aparatos. En este sentido 136 (37,1%) presentaron disfunción cardiovascular, 44 (12%) hipotensión refractaria, 59 (16,1%) disfunción respiratoria, 31 (8,4%) lesión pulmonar aguda, 21 (5,7%) síndrome de distrés respiratorio tipo adulto, 75 (20,4%) disfunción neurológica con un valor medio en la escala de Glasgow al ingreso de 13,67 (2,07) y el valor medio del peor registrado de 12,89 (2,93), 55 (15%) oligoanuria, 30 (8,2%) disfunción renal, 103 (28,1%) coagulación intravascular diseminada, 22 (6%) disfunción hepática, 237 (64,6%) púrpura (ver figura 26). La forma más frecuente de presentación fueron las petequias en 198 (54%). 38 (10,4%) pacientes presentaron equimosis y 2 (0,5%) hemorragias. 58 (15,8%) de los afectados no tuvieron púrpura. Por otro lado 24 niños (6,5%) sufrieron compromiso vascular.

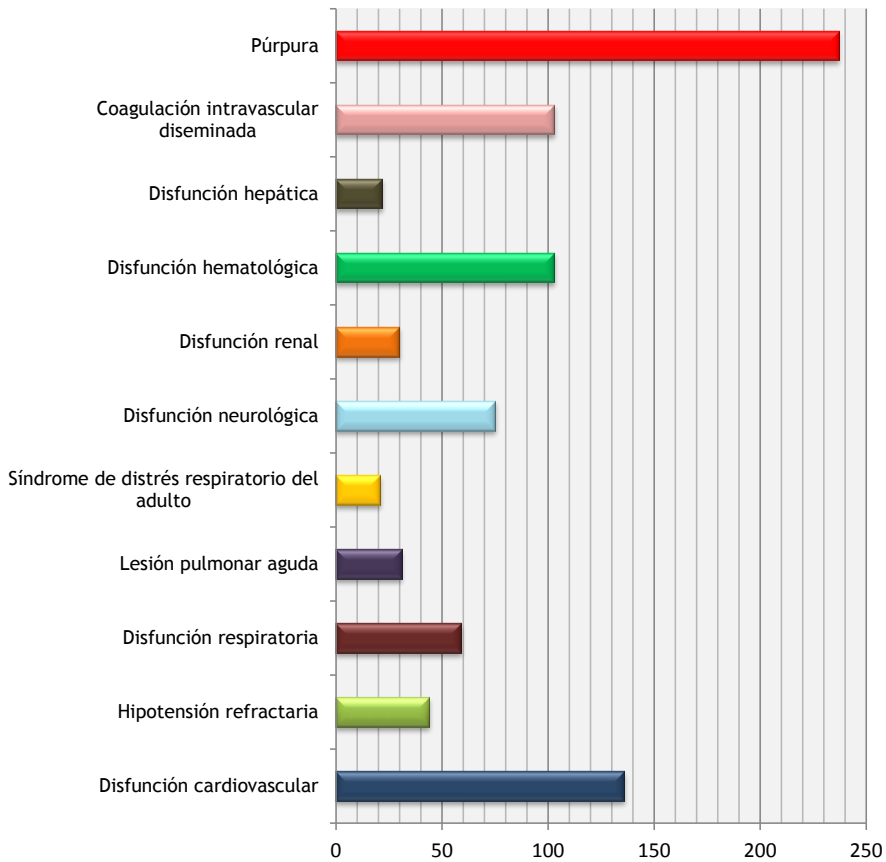


Figura 26. Formas de presentación clínica más frecuentes.

Los pacientes con diagnóstico de sepsis o sepsis y meningitis al ingreso tuvieron de manera significativa ($p < 0,01$) mayor número casos de disfunción cardiovascular, neurológica, respiratoria, hematológica, coagulación intravascular diseminada y oliguria que los que ingresaron con el diagnóstico de meningitis.

En cuanto a la púrpura y sus formas de presentación ésta fue significativamente más frecuente en pacientes con sepsis y sepsis con meningitis que en aquellos que presentaron únicamente meningitis (89% y 79% frente a 18%, $p < 0,001$).

Otras formas de presentación menos frecuentes están recogidas en la tabla 12.

Formas de presentación	Número de casos
Artralgias	1
Artritis	3
Convulsión	1
Diarrea	3
Miocarditis	4
Neumonía	1
Hemorragia intracraneal	2
Hemorragia digestiva	3
Colitis	1
Parálisis facial	1
Síndrome pierde sal	1
Vómitos	1
Hiperamilasemia	1
Hipoglucemia	1

Tabla 12. Formas de presentación clínica menos frecuentes.

De los 366 pacientes afectados de enfermedad meningocócica, 13 (3,55%) fueron éxitus, 8 varones y 5 mujeres. No hubo diferencias significativas en cuanto al nivel socioeconómico. Las causas de muerte fueron: 6 casos por síndrome de disfunción orgánica múltiple, 3 por shock refractario, 2 por muerte cerebral, 1 por hemorragia intracraneal y shock, 1 por hemorragia no especificada.

Por otro lado, ocho (2,2%) pacientes, a pesar de seguir una evolución globalmente favorable, precisaron injertos, a 9 (2,45%) se les realizó amputación de alguna falange, o, en el peor de los casos miembro inferior. No se analizaron secuelas a medio y largo plazo. La situación de los pacientes dados de alta fue valorada mediante las escalas de Glasgow y la POCP (ver tabla 13).

Puntuación	Glasgow/POPC
1	7/245
2	1/8
3	3/14
4	5/4
5	267/3
Total	283/274

Tabla 13. Situación clínica al alta de los pacientes afectados de enfermedad meningocócica según las escalas de Glasgow y POPC.

7.1.5. Características microbiológicas

7.1.5.1. Gram

Se realizó la técnica de visualización directa del meningococo mediante tinción de gram en 169 (78,24%) de los casos. En 128 (55,62%) casos se visualizó el diplococo; 82 (64,06%) en LCR y 39 (41,48%) en sangre. Se realizaron pruebas rápidas de detección de antígenos en 30 (13,88%) casos siendo positivas en 13 (43,3%), 7 (53,84%) en LCR, 6 (46,15%) en sangre. No se realizaron pruebas rápidas en 94 pacientes y 80 centros no disponían de ellas. En cuanto a detección de ADN de meningococo, se realizó en 34 (15,74%) casos siendo positiva en 12 (35,29%) pacientes, 10 (83,33%) en muestras de sangre y 2 (16,66%) en LCR.

7.1.5.2. Serología

Se realizó serología de *N. meningitidis* en 8 (3,70%) casos siendo negativa en 7 (87,5%) casos.

7.1.5.3. Cultivo

Se realizó cultivo de muestras de sangre y/o LCR en todos los casos. Se aisló meningococo en al menos 233 (63,66%) muestras, 160 (68,66%) en sangre, 199 (85,45%) en LCR, 21 (14%) en LCR y sangre a la vez, 2 (0,85%) en petequias y 1 (0,42%) en líquido pericárdico.

De los pacientes en los que se aisló la bacteria, en 197 (84,54%) el meningococo aislado fue el B, en 16 (6,86%) la bacteria aislada correspondió al meningococo C, en 1 (0,42%) W135, en 11 (7,33%) casos el dato no estaba disponible y no se obtuvo el serogrupo en 3 casos (2%), ver figura 27. Sólo se recogió el serotipo de 8 bacterias: serotipos 1 en 4 meningococos B, serotipos 4 en otros 3 meningococos B y serotipo 1 en un meningococo C. 1 meningococo B era del serosubtipo P1.14, 2 del P1.15 estando este dato ausente en 146 muestras.

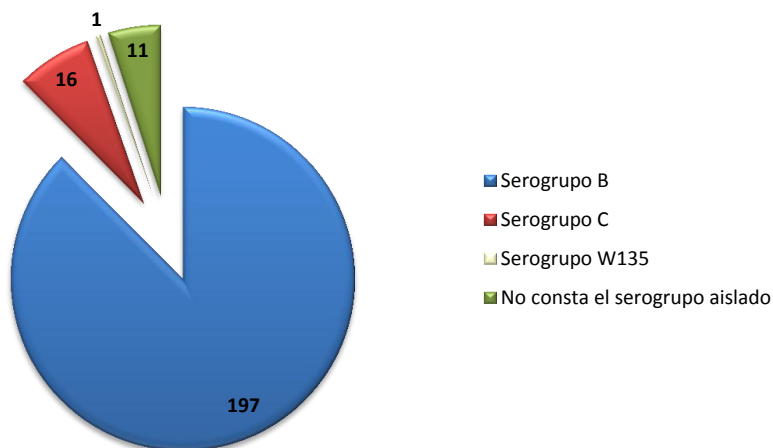


Figura 27. Distribución de serogrupos aislados en los casos confirmados de enfermedad meningocócica.

7.1.6. Características analíticas de los pacientes con enfermedad meningocócica

Los datos analíticos menos favorables durante las primeras 24 horas fueron los representados en la tabla 14.

Parámetro	n	Media (DS)	Rango
Leucocitos	297	18547 (23013,05)	80-357000
Cayados	191	22,78 (19,72)	0-95
Plaquetas	292	222603,08 (132496,1)	7,34 3-781000
pH	261	7,31 (2)	7-7,40
pCO2	265	38,36 (14,79)	17-115
HCO3	249	20,11 (18,01)	13-25
Láctico sérico	193	9,3 (19,08)	0-210
Potasio	273	4,41 (7,31)	1,7-10,4
Calcio	228	9,26 (10,15)	5-84
Glucosa	291	120,67 (52,616)	20-509
Troponina	51	0,39 (0,99)	0-5,7
CK	90	563,85 (1813,93)	0-12716
CK-MB	33	33,62 (58,64)	0-227
Creatinina	206	0,67 (0,83)	0,1-9
Urea	280	32,8 (31,38)	9-481
Fibrinógeno	230	401,94 (262,43)	0-966
TP (s)	134	23,12 (20,54)	1,8-148
TTPA (s)	224	47,09 (42,44)	20-415
PDF	92	129,94 (268,754)	1-1050
DD	113	2998,89 (5589,47)	20-5781
ATIII	31	63,06 (20,66)	13-96
Proteína C	11	32,63 (21,68)	31-72
Proteína S	81	50	
Procalcitonina	167	18,48 (25,03)	50-136
PCR	232	76 (150,62)	0,1-1536
VSG	145	35,22 (36,74)	5-117
Células en LCR	194	2715 (8182,44)	1-100300
Cortisol	8	89,95 (130,83)	5-317
ACTH	85	153 (101,82)	81-225
pO2/FiO2	81	300,71 (127,52)	2-500

Tabla 14. Datos analíticos menos favorables durante las primeras 24 horas.

7.1.7. Tratamiento administrado en los pacientes afectados de enfermedad meningocócica

Se realizó expansión de volumen en 323 (88,25%) pacientes: menos de 10 ml/kg en 12 casos (3,7%), 10-20 ml/kg en 69 (21,36%), 20-30 ml/kg en 34 (10,52%),

30-40 ml/kg en 27 (8,35%), más de 40 ml/kg 44 (13,62%). En 137 casos si bien se realizó expansión de volumen no constaba la cantidad administrada.

Se empleó tratamiento inotrópico en 138 (37,7%) casos: dopamina en 107 (29,23%), dobutamina en 55 (15,02%), noradrenalina en 51(13,93%), adrenalina en 32 (8,72%), milrinona en 11 (3%), terlipresina en 3 (1,38%) y fenilefrina 9 (2,45%).

Se administró plasma en al menos 70 (19,1%), concentrado de hematíes en 65 (17,7%), plaquetas en 26 (7,1%), crioprecipitados en 1 (0,3%), prothromplex en 1 (0,3%) y proteína C activada en 1 (0,3%).

En cuanto a los antibióticos administrados, se utilizó cefotaxima en 171 (46,6%), ceftriaxona en 70 (20%), vancomicina en 43 (15,7%), teicoplanina en 5 (1,4%), meropenem en 2 (0,5%). También se empleó ampicilina en 7 (1,91%), piperacilina-tazobactam en 1 (0,3%), cloxacilina en 1 (0,3%) e imipenem en 1 (0,3%). Se empleó corticoides en 115 casos (31,4%), en 72 (19,67%) a dosis de meningitis purulenta, en 18 (5%) a dosis de estrés. En 107 casos no se administró corticoterapia. De los afectos de enfermedad meningocócica 209 precisaron oxigenoterapia, en 162 (44,26%) mediante mascarilla, 43 (11,7%) ventilación mecánica, 4 (1,09%) ventilación no invasiva. El tiempo medio de intubación en aquellos permanecieron conectados a ventilación mecánica fue de 4,33 (4,32) días con un tiempo máximo de 45 días de intubación.

En 11(3%) casos se realizó hemofiltración veno-venosa continua, en 6 de alto flujo y en 4 de ellos convencional y en dos casos plasmafiltración.

7.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES FALLECIDOS

7.2.1. Características demográficas y antecedentes familiares y personales de enfermedad

En la serie analizada acontecieron 14 éxitus (4%). Las causas de muerte fueron: 6 casos por síndrome de disfunción orgánica múltiple, 4 por shock refractario, 2 por muerte cerebral, 1 por hemorragia intracraneal y shock, 1 por hemorragia no especificada, ver figura 28.

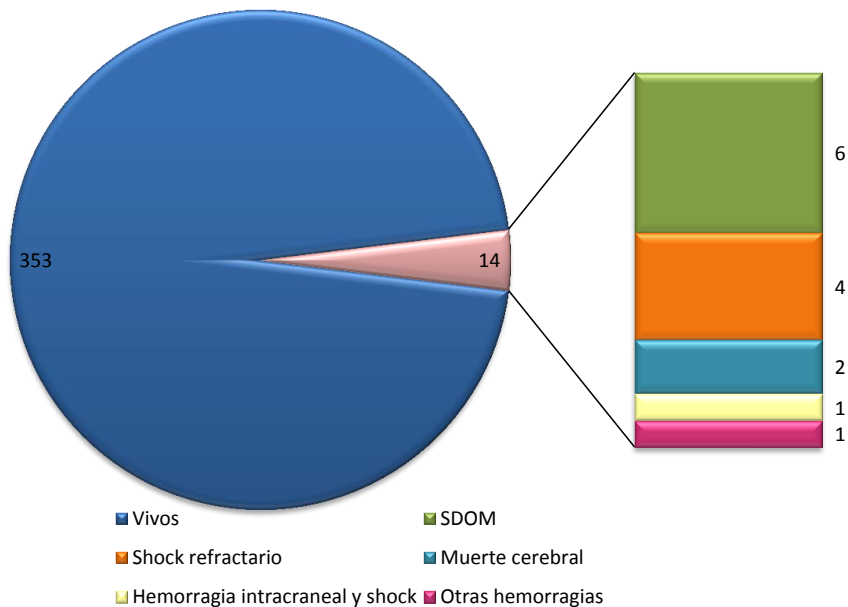


Figura 28. Causas de muerte por sepsis meningocócica

En todos los pacientes la muerte ocurrió en las primeras 24 horas del ingreso en la unidad de cuidados intensivos y en 6 (66,66%) en las primeras 12 horas de ingreso.

De los pacientes fallecidos 5 (2,4%) fueron varones y 9 (7,2%) mujeres. La edad media fue de 4,76 (4,99) años, siendo el menor de 1 año y el mayor de 17,1 años. En cuanto al grupo poblacional, 7 eran europeos occidentales, 1 norte-africano

y 1 paciente era de origen americano. La distribución de pacientes por Comunidad Autónoma según sus lugares de origen está representada en la tabla 15.

Variable	n (promedio)
Total	14
Sexo	5 (35,71%) Varones 9 (64,28%) Mujeres
Edad	4,76 (4,99)
Comunidad autónoma	8 (57,14%) Galicia 3 (21,42%) Cantabria 1 (7,14%) País Vasco 1 (7,14%) Cataluña 1 (7,14%) Madrid
Grupo poblacional	7 (77,7%) Europeo occidental 1 (11,1%) Norteafricano 1 (11,1%) América Central 4 (1,9%) América Sur

Tabla 15. Características demográficas de los pacientes que fallecieron por enfermedad meningocócica.

En relación a los antecedentes de enfermedad, un niño presentaba vitíligo y, además, era portador de un mosaicismo. En el resto no constaba ningún antecedente patológico de interés.

Con respecto al estado vacunal frente al meningococo, diez de los fallecidos recibieron la vacuna conjugada frente al meningococo C, uno frente al A y C, un paciente no estaba vacunado y dos casos se desconocía este dato.

7.2.2. Características clínico- evolutivas

En nuestra serie, ninguno de los pacientes fallecidos estaba recibiendo antibióticos previamente a ser diagnosticados de enfermedad meningocócica.

El diagnóstico de entrada fue de shock séptico en 12 (85,71) casos y de sepsis en dos. Cinco pacientes presentaban, además, meningitis, en siete no se realizó

análisis de LCR. Todos ingresaron en la UCIP. En todos los casos se confirmó el diagnóstico de enfermedad meningocócica. El serogrupo más frecuentemente aislado fue el B (10 casos) seguido del C (dos casos). En otros dos casos se desconocía el serogrupo.

Desde el punto de vista evolutivo, el tiempo medio de evolución desde el inicio de los síntomas hasta el ingreso fue de 13 (5,07) horas, con un rango de 5 a 24 horas. Paralelamente, el tiempo medio de evolución desde la aparición de las primeras lesiones cutáneas hasta el ingreso fue de 3,28 (3,03) horas con una mediana de 2 horas. No se encontraron diferencias significativas ($p = 0.7$) en el tiempo medio entre la aparición de los síntomas y la aparición de Petequias y el ingreso entre el grupo de supervivientes y el de éxitos, tal y como se refleja en la figura 29.

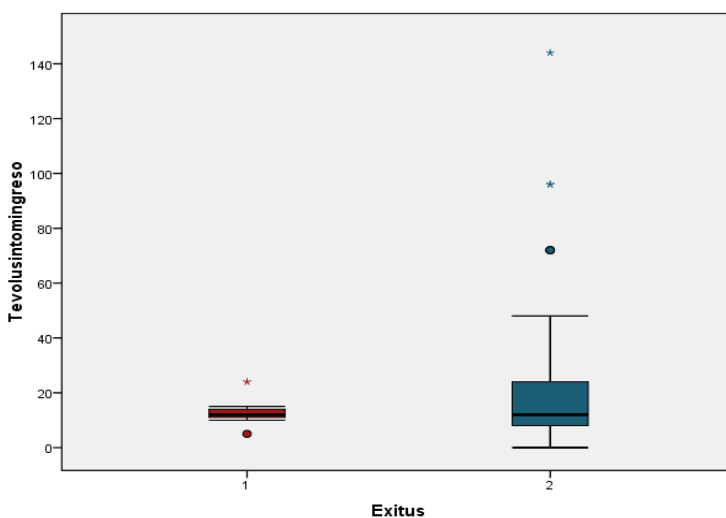


Figura 29. Comparativa del tiempo medio desde la aparición de los síntomas hasta el ingreso en el grupo de supervivientes (azul) y el de éxitos (rojo).

El promedio de estancia hospitalaria fue de 0,55 días frente a 12,5 días en el grupo de supervivientes, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$).

En cuanto a la púrpura, seis presentaron equimosis, y dos exantema petequeal con un promedio de afectación de superficie corporal del 62,62% (43,87); un paciente no desarrolló lesiones purpúricas. Todos los fallecidos excepto uno tuvieron

compromiso vascular distal previo y dos de ellos precisaron la amputación de extremidades.

En relación al grado de afectación por aparatos, todos presentaron disfunción cardiovascular y 12 disfunción neurológica, 11 oligoanuria y disfunción respiratoria, ocho lesión pulmonar aguda, seis síndrome de distrés respiratorio tipo adulto, nueve disfunción renal, 12 disfunción hematológica, 10 coagulación intravascular diseminada y siete disfunción hepática (ver figura 30).

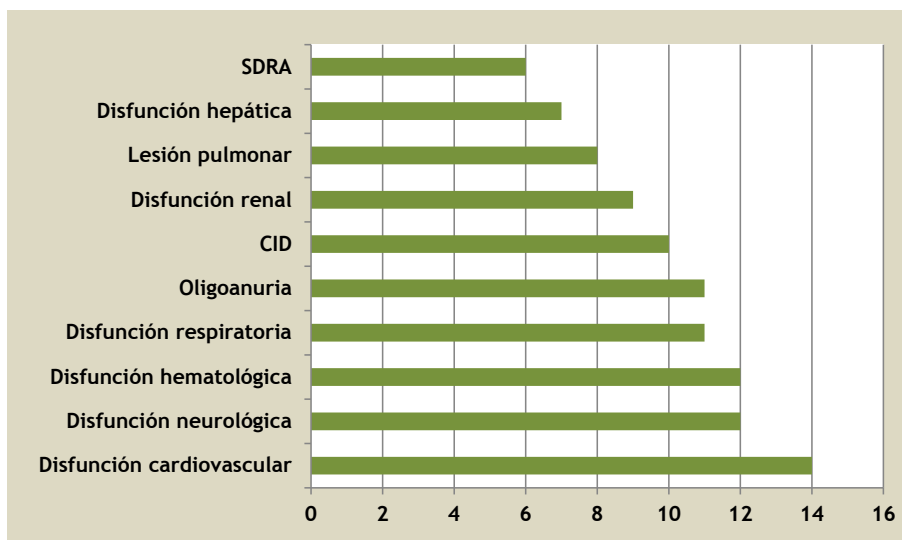


Figura 30. Forma de presentación clínica en los pacientes fallecidos.

Los datos analíticos menos favorables durante las primeras 24 horas de los pacientes fallecidos están reflejados en la tabla 16.

Parámetro	n	Media (DS)	Rango
Leucocitos	14	8060 (7285,16)	1010-22600
Cayados	11	21 (13,98)	2-57
Plaquetas	14	100714,3 (105595,3)	10000-357000
pH	13	7,10 (0,16)	6,8-7,4
pCO2	12	57,83 (31,39)	27-105
Láctico sérico	12	15,05 (19,58)	2-76
Potasio	13	3,21 (0,74)	1,7-4,2
Calcio	13	7,1 (1,30)	5-9,8
Glucosa	13	155,92 (148,61)	20-509
Creatinina	11	1,05 (0,33)	0,6-1,57
Urea	13	50,76 (16,87)	20-76
Fibrinógeno	8	156,25 (212,08)	2-665
TP (s)	6	38 (40,75)	10-120
TP (%)	8	29,4 (14,7)	12-56
TTPA (s)	7	77,54 (44,32)	32-151
INR	3	4,23 (2,02)	1,93-5,76
PDF	1	37	
Dímeros D	5	7298 (6986,92)	2000-18091
Antitrombina	3	73 (14)	59-87
III	3	46 (22,6)	31-72)
Proteína C	0		
Proteína S	8	115,6 (156,39)	11-390
PCR	9	84,13 (5,56)	0,9-390
VSG	6	1,1 (2,26)	0,00-5,7
Troponina	9	1790 (2665,22)	63-6567
CK	4	88 (89,64)	10-216
CK-MB	11	147,35 (94,02)	31-300
PaO2/FiO2	11	134,18 (95,26)	2-300
Cortisol	5	15 (14,67)	5-40
Células LCR	5	1655,66 (2724,06)	10-4800

Tabla 16. Datos analíticos menos favorables en las primeras 24 horas de los pacientes fallecidos.

En cuanto a las escalas de valoración de la gravedad clínica, según la escala de PRISM el valor promedio fue de 40,22 (16,66) puntos y según la escala MSSS fue de 6 puntos (2,82).

7.2.3. Tratamiento administrado en los pacientes fallecidos

En relación al volumen de líquidos administrado en las dos primeras horas del tratamiento, en cuatro se realizó expansión de volumen a más de 40 ml/Kg, tres precisaron expansión con 20-30 ml/kg, dos con menos de 10 ml/kg y uno con 10-20 ml/kg. Se emplearon aminas vasoactivas en todos los pacientes: dopamina en seis (dosis máxima de 30 mcg/kg/min), noradrenalina en seis (dosis máxima 10 mcg/kg/min), dobutamina en cinco (dosis máxima de 40 mcg/kg/min), adrenalina en cuatro (dosis máxima 5 mcg/kg/min). En algunos casos se utilizó una combinación de aminas: dopamina más dobutamina en tres pacientes, dopamina más dobutamina más adrenalina en dos y dopamina más adrenalina en otros dos. En dos casos se empleó terlipresina.

En un caso se administró proteína c activada y en otro factor VII recombinante.

Se emplearon corticoides en seis (66,6%) casos, en tres a dosis de meningitis purulenta y en los otros tres a dosis de estrés.

Se realizó transfusión de plasma a seis (66,6%) pacientes, hematíes a cuatro (44,4%) y plaquetas a cuatro (44,4%).

La antibioterapia empírica de elección fue la cefotaxima en cinco casos, cefotaxima en combinación con vancomicina en un caso y ceftriaxona en tres.

De los pacientes fallecidos, ocho precisaron intubación endotraqueal y ventilación mecánica.

**BLOQUE II: ANÁLISIS DEL ADN
MITOCONDRIAL**

7.3. RESULTADO DEL ANÁLISIS GENÉTICO

7.3.1. Correlación de las variables clínicas con los genotipos encontrados

7.3.1.1. Valoración de la ancestralidad de los pacientes

El análisis de ancestralidad fue llevado a cabo mediante la clasificación de grupos poblaciones en africano, americano y europeo. Como se muestra en la figura 31 la mayoría (95%, SD 10%) de los casos pertenecían al grupo europeo similar a los valores obtenidos en una base de datos europea. En la figura 31b se representa el plotter de PCA en la que se demuestra claramente la agrupación de pacientes en un grupo, al igual que las muestras africanas y las americanas. El porcentaje de variación encontrado entre los grupo PC1, PC2 y PC3 fue de 29%, 17% y 13% respectivamente; 59% en total.

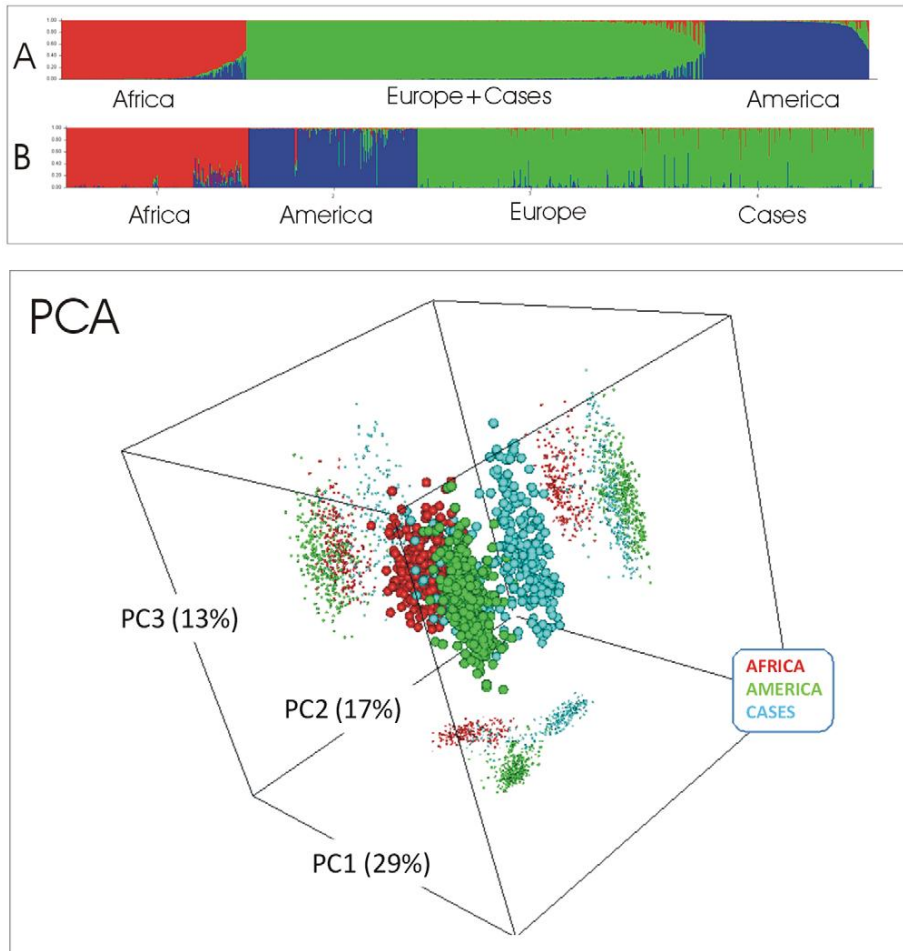


Figura 31. Análisis poblacional de los casos de EM. En la gráfica superior, se representa el análisis realizado con STRUCTURE para las poblaciones del panel del CEPH (incluyendo 225 africanos, 208 americanos nativos y 278 europeos; ver texto para más detalles) y 307 pacientes afectados de enfermedad meningocócica; el análisis está basado en un panel de AIMs que implica 34 SNPs autosómicos para la asignación del origen ancestral; el valor de agrupación es $K = 3$. En panel superior (A) se representa las muestras agrupadas en función del porcentaje creciente de ancestralidad compartida, mientras que en (B) las muestras se presentan tal y como se introdujeron en el análisis. La gráfica inferior muestra el análisis de componentes principales para los mismos AIMs, en concreto el component uno (PC1), dos (PC1) y tres (PC1). En paréntesis se muestra el porcentaje de variabilidad absorbido por cada component.

7.3.1.2. Evaluación de la posible asociación entre los haplogrupos del ADNmt y las variantes clínico-epidemiológicas

En base a los resultados de los AIMs se eliminaron 39 individuos del análisis estadístico, incluyendo 14 pacientes de etnia gitana, ya que no cumplían con los requisitos de grupo poblacional europeo. El análisis de asociación se realizó mediante la comparación entre 268 casos y los 917 del grupo control 1 (GC1). El poder para detectar odds ratio fue del 1.6 para SNPmt y considerando un porcentaje mínimo de frecuencia alélica en la población (MAF) del 20%, éste fue del 92%. Se utilizó el test exacto de Fisher y la chi-cuadrado de Pearson para estudiar la posible asociación. El ajuste por test multiple se llevó a cabo realizando 20.000 permutaciones según lo descrito en el trabajo de Mosquera¹⁸ y cols. El análisis de asociación sugirió una sobreexpresión de la variante del SNPmt **G11719A** ($p = 0.0188$; OR [95% CI] = 1.63 [1.22 -2.18]) en el grupo de casos de enfermedad meningocócica con respecto al GC1 (ver tabla 17)

SNP	rCRS ref.	MAF cases	MA	MD cases versus CG1				MD cases versus CG2					
				MAF	Chi2 exact	P-value	adjusted P-value	MAF	Chi2 exact	P-value	adjusted P-value	OR (95% CI)	
G3010A	G	0.28	A	0.29	1.2372	0.266	0.9918	0.83 (0.61–1.15)	0.28	0.3997	0.527	1	0.90 (0.64–1.25)
T3197C	T	0.06	C	0.06	0.0356	0.85	1	0.95 (0.53–1.68)	0.10	4.0081	0.045	0.532	1.78 (1.01–3.14)
G3915A	G	0.02	A	0.02	0.8348	0.361	0.999	0.57 (0.17–1.94)	0.04	4.8407	0.028	0.374	0.28 (0.08–0.94)
C3992T	C	0.01	T	0.01	0.1432	0.705	1	0.78 (0.22–2.77)	0.01	0.0008	0.977	1	0.98 (0.25–3.82)
T4216C	T	0.17	C	0.18	0.0647	0.799	1	0.95 (0.66–1.37)	0.16	0.1798	0.672	1	0.92 (0.62–1.35)
T4336C	T	0.02	C	0.03	2.3434	0.127	0.8886	0.40 (0.12–1.35)	0.04	4.8627	0.027	0.3628	0.28 (0.08–0.94)
A4529T	A	0.02	T	0.02	0.1596	0.69	1	1.21 (0.47–3.10)	0.00	10.2116	0.004	0.0659	14.04 (1.68–117.18)
G4580A	G	0.04	A	0.04	2.8558	0.091	0.7941	0.60 (0.33–1.09)	0.03	4.5172	0.034	0.4381	0.49 (0.25–0.96)
A4769G	A	0.02	A	0.02	0.0002	0.989	1	0.99 (0.36–2.72)	0.00	11.2448	0.003	0.0469	–
A4793G	A	0.00	G	0.00	7.1652	0.007	0.1121	–	0.01	0.0735	0.786	1	0.80 (0.16–4.00)
T6776C	T	0.08	C	0.09	0.9034	0.342	0.9988	0.77 (0.46–1.32)	0.04	2.4415	0.118	0.8732	1.62 (0.90–3.01)
C7028T	C	0.47	T	0.49	6.1755	0.013	0.2	1.42 (1.08–1.87)	0.45	1.3431	0.246	0.9906	1.19 (0.89–1.59)
G8994A	G	0.02	A	0.02	2.3745	0.123	0.8827	1.90 (0.83–4.35)	0.02	2.6354	0.105	0.8395	2.10 (0.84–5.22)
G9055A	G	0.06	A	0.06	2.7059	0.1	0.8244	1.53 (0.92–2.55)	0.10	0.1954	0.658	1	0.89 (0.54–1.48)
A10398G	A	0.19	G	0.18	1.4671	0.226	0.9835	1.23 (0.88–1.73)	0.20	0.4369	0.509	1	1.13 (0.79–1.61)
C10400T	C	0.01	T	0.01	2.6015	0.107	0.8459	2.30 (0.81–6.53)	0.01	2.2218	0.136	0.9139	2.32 (0.74–7.27)
T10463C	T	0.10	C	0.10	0.0700	0.791	1	1.06 (0.68–1.67)	0.09	0.6038	0.437	0.9999	1.21 (0.74–1.97)
C10873T	C	0.03	C	0.02	4.9968	0.025	0.3374	0.46 (0.22–0.92)	0.04	0.6441	0.422	0.9999	0.75 (0.38–1.51)
G11719A	G	0.41	A	0.38	10.7820	0.001	0.0188	1.63 (1.22–2.18)	0.47	0.3430	0.558	1	1.09 (0.82–1.46)
A12308G	A	0.17	G	0.18	0.6261	0.429	0.9998	0.86 (0.59–1.25)	0.24	7.7546	0.006	0.0927	0.59 (0.40–0.86)
C12705T	C	0.09	T	0.08	6.5570	0.01	0.1549	1.75 (1.14–2.71)	0.07	7.1341	0.010	0.1533	1.89 (1.18–3.03)
G13708A	G	0.09	A	0.09	0.6741	0.412	0.9994	0.81 (0.48–1.35)	0.09	0.5517	0.458	1	0.82 (0.48–1.39)
A13966G	A	0.02	G	0.01	3.6348	0.057	0.6202	2.35 (0.95–5.81)	0.02	0.4319	0.511	1	1.34 (0.56–3.24)
C14766T	C	0.44	C	0.43	4.2540	0.039	0.4805	1.33 (1.01–1.75)	0.48	0.1177	0.752	1	1.05 (0.79–1.40)
T16519C	T	0.33	T	0.33	0.4574	0.499	1	1.11 (0.82–1.49)	0.35	1.3385	0.247	0.9911	1.20 (0.88–1.63)

rCRS: allele in the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) [55]; MA: allele with the lowest frequency; MAF: minimum allele frequency computed on control individuals; Adjusted P-value: adjustment of chi-square P-values was carried out with a permutation-based approach; number of permutations = 20,000; OR (95%CI): ORs were computed with the rCRS allele as a reference.

Tabla 17. Resultado obtenido del test de Chi-cuadrado de Pearson para la comparación entre el grupo de casos y el grupo control 1 y el grupo control 2.

Con el fin de confirmar esta asociación se llevó a cabo un segundo análisis con otro grupo control independiente. Sin embargo, puesto que la prevalencia de enfermedad meningocócica es baja el reclutamiento de otro grupo independiente de casos no fue posible. La alternativa entonces fue replicar la variante G11719A en una segunda muestra de controles. El procedimiento fue similar al previo, los casos fueron comparados con un segundo grupo de controles (GC2; $N = 616$); atendiendo a la variable de grupo poblacional. El poder para detectar odd ratio de un determinado SNPmt fue de 1.6 y en GC2 fue de 88%. La asociación G11719A obtenida de la comparación entre el grupo de casos y el GC1 no fue observada en la comparación entre el grupo de casos y el GC2. No obstante, la variante A4769G apareció como estadísticamente significativa ($p = 0,0469$), aunque en el límite si consideramos un valor de significancia de 0,05; ver tabla 18.

El análisis de ADNmt obtenido de individuos sanos españoles de distintas áreas geográficas refuerzan la idea de la naturaleza espúrea de la asociación encontrada en los casos versus GC1 para el polimorfismo G11719A. La asociación observada puede deberse al sesgo de la estratificación poblacional; concretamente la frecuencia de **G11719A** en el GC1 es particularmente baja.

Por otro lado se llevó a cabo el análisis de los haplogrupos del grupo de casos y del grupo de controles (ver tabla 16). El mejor valor de p obtenido fue para el haplogrupo R (0.005), que sin embargo, no pudo confirmarse tras realizar el test múltiple de Bonferroni (ajustado como valor $p = 0.00058$).

HG	Freq. Cases	HG status in cases versus CG1				Freq. CG1	HG status in cases versus CG2			
		Chi2 exact	Avalue	OR (95% CI)	Chi2 exact		Avalue	OR (95% CI)	Freq. CG2	
H	0.41	5.2881	0.021	1.38 (1.04–1.82)	0.41	0.9834	0.321	1.16 (0.87–1.55)	0.45	
H1	0.20	0.0485	0.826	0.96 (0.68–1.35)	0.20	0.0453	0.831	1.04 (0.73–1.48)	0.21	
H3	0.07	1.1113	0.292	1.33 (0.78–2.26)	0.09	1.2397	0.266	0.71 (0.39–1.30)	0.05	
HV	0.47	2.4663	0.116	1.24 (0.95–1.63)	0.53	0.0086	0.926	1.01 (0.76–1.35)	0.48	
I	0.02	0.0454	0.831	1.11 (0.41–3.01)	0.02	5.6451	0.018	0.17 (0.04–0.89)	0.00	
J	0.06	1.1921	0.275	1.36 (0.78–2.39)	0.08	0.6421	0.423	1.27 (0.71–2.29)	0.07	
J1	0.04	1.0250	0.311	1.39 (0.73–2.63)	0.06	1.0010	0.317	1.40 (0.72–2.73)	0.06	
K	0.08	1.4794	0.224	0.73 (0.44–1.22)	0.06	0.0738	0.786	1.07 (0.64–1.80)	0.09	
K1	0.07	1.5110	0.219	0.71 (0.41–1.23)	0.05	0.1968	0.657	1.13 (0.65–1.96)	0.08	
R	0.87	8.0561	0.005	1.87 (1.21–2.90)	0.93	7.1341	0.008	1.89 (1.18–3.03)	0.93	
R0	0.50	4.3115	0.038	1.33 (1.02–1.75)	0.58	0.0885	0.766	1.04 (0.78–1.39)	0.51	
T	0.10	0.1017	0.750	0.93 (0.58–1.47)	0.09	0.4751	0.491	0.84 (0.51–1.38)	0.08	
TJ	0.16	0.2749	0.600	1.10 (0.76–1.60)	0.17	0.0008	0.978	1.01 (0.68–1.49)	0.16	
U	0.17	0.0244	0.876	1.03 (0.72–1.48)	0.18	4.9115	0.027	1.51 (1.05–2.18)	0.24	
U5	0.04	0.6841	0.408	1.31 (0.69–2.49)	0.06	7.6008	0.006	2.39 (1.26–4.51)	0.10	
V	0.06	2.8237	0.093	0.60 (0.33–1.09)	0.04	4.4651	0.035	0.50 (0.26–0.96)	0.03	
W	0.01	0.2851	0.593	0.93 (0.23–2.34)	0.01	0.1928	0.661	0.76 (0.22–2.61)	0.01	

The test was carried out for those (sub)hgs with frequencies above 5% in the control groups and also the well-known branches of the West European/Iberian phylogeny L, V, and W. Note that hg frequencies were inferred using the information from the whole haplotype available; this is why for instance, the frequency of hg R0 does not match with the frequency of G11719A.

Tabla 18. Test de Chi-cuadrado de Pearson para la comparación de los haplogrupos entre el grupo de casos y el CG1 y el grupo de casos y el CG2.

Entre las múltiples variables clínicas analizadas en el presente estudio, el distrés respiratorio tipo adulto se asoció fuertemente con el haplogrupo U (regresión logística multinomial, $p = 0,0025$), siendo por tanto el haplogrupo U un factor predictor del síndrome de distrés respiratorio tipo adulto (OR [95% CI] = 12.58 [2.41-64.93]); ver figura 26. Sin embargo, esta asociación se perdió al ajustar el modelo mediante la corrección de Bonferroni y considerando todas las hipótesis testadas en el estudio.

8. DISCUSIÓN

“La palabra imposible no está en mi vocabulario”

(Napoleón Bonaparte)

Nuestro trabajo consituye la serie prospectiva más amplia de casos de enfermedad meningocócica pediátrica publicada hasta la fecha. Otras series también amplias como la de Harrison y cols¹⁹, que recoge 295 casos siendo 115 de ellos mayores de 25 años o como la de Levin y cols⁹³ con 393 casos de casos con enfermedad meningocócica, fueron recogidos de manera retrospectiva. El presente estudio ofrece una visión extensa y detallada sobre las características de la enfermedad meningocócica en la edad pediátrica en España. Además, se lleva a cabo por primera vez el análisis del ADN mitocondrial en los niños afectos de EM para la búsqueda de derminantes que pudiesen condicionar un aumento de la susceptibilidad a padecerla o un peor pronóstico, y se excluye con rigor que la EM tenga una base genética mitocondrial.

8.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y EPIDEMIOLÓGICAS

La expresión clínica y el pronóstico de la EM vendrán determinados por una compleja interacción entre los factores del huésped y el microorganismo. El diagnóstico precoz de la EM es fundamental ya que la progresión de la enfermedad es rápida, existe un corto periodo de ventana en el que el tratamiento es útil y las muertes se producen en las primeras 24 horas del ingreso. En nuestra serie, el 80-90% de los casos de sepsis o sepsis con meningitis presentó petequias las cuales fueron de inicio precoz (media de 3,28 horas). Este hecho hizo posible la rápida sospecha de la enfermedad permitiendo así el inicio inmediato del tratamiento antibiótico empírico. Sin embargo, en el trabajo de Thompson y cols²³⁶ se encontró que la presencia del rash petequeial tan sólo ocurrió en el 42-70% lo que puede justificar el retraso del diagnóstico dado que otros síntomas tales como fiebre, cefalea, rinorrea, fotofobia, artralgias...son más inespecíficos. La situación hiperendémica de la enfermedad meningocócica en nuestro medio, puede justificar también un mayor índice de alarma por parte de la población ante la aparición de las primeras petequias, lo que aumenta la sensibilidad de dicho signo clínico ya en sus fases iniciales, pero también estará acompañado de una importante tasa de falsos negativos.

Entre las características demográficas de la muestra cabe destacar que el 65% de los casos proceden del norte de España. Si bien este hecho podría estar explicado exclusivamente por un mayor grado de colaboración de los subinvestigadores y centros colaboradores de este área geográfica, esta mayor prevalencia de la enfermedad en la zona norte de España en comparación con el resto del territorio nacional está bien documentada. Nuestros datos coinciden con los publicados en el boletín epidemiológico del Centro Nacional de Epidemiología del Ministerio de Sanidad y Consumo⁴¹ que sitúan las tasas de incidencia más altas en Galicia, Navarra, Cantabria, Ceuta y País Vasco, comunidades autónomas donde existe una alta incidencia del serogrupo B. En el análisis de las diferentes variables clínico-epidemiológicas recogidas en nuestro estudio no se ha encontrado ningún factor que justifique las diferencias en la prevalencia de la enfermedad en España.

Otro aspecto importante a tener en cuenta en este punto es qué impacto podría tener la variabilidad climática y las características medio-ambientales en la enfermedad meningocócica. En España, coincidiendo con otros autores^{4,24}, dos tercios de los casos ocurrieron en los meses fríos y húmedos. A raíz de los análisis epidemiológicos centrados en el cinturón africano de la EM, se conoce cómo las condiciones de humedad y del terreno distinguen zonas de alto y de bajo riesgo para la enfermedad⁴⁷.

Dos tercios de los casos de EM ocurrieron en los meses fríos (octubre, noviembre, diciembre, enero, febrero y marzo).

La mayor incidencia de los casos de EM descritos en nuestro trabajo se encuentra en menores de 5 años (Ver figura 32), lo cual coincide con los datos recogidos por el Ministerio de Sanidad⁴¹. No obstante, otros grupos como el de Harrison¹⁹ observan o dos picos de incidencia de la enfermedad: un pico en menores de 5 años y otro en la adolescencia. Este hecho puede justificarse por la falta de vacunación frente al meningococo C en este grupo de edad, serogrupo de mayor incidencia encontrada en dicho trabajo y que presenta este característico comportamiento bimodal. Otro punto a tener en cuenta y que cada vez cobra mayor importancia es la exposición al humo de tabaco. Dado que la edad más frecuente de inicio al tabaquismo se sitúa en la adolescencia y teniendo en cuenta que algunos trabajos⁵⁴ demuestran el aumento de incidencia de EM entre los fumadores, éste podría ser un factor de riesgo a tener en cuenta en este grupo de edad.

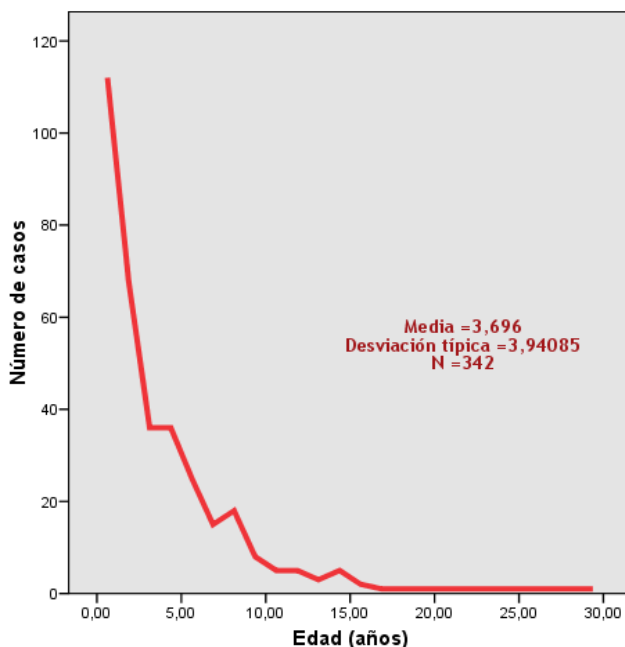


Figura 32. Incidencia de casos de enfermedad meningocócica por edad.

Hasta un tercio de los pacientes presentaban shock séptico en el momento del ingreso. El porcentaje de pacientes que presentaban shock séptico al ingreso fue similar en los grupos con y sin meningitis. Además, en nuestra serie la mitad de los pacientes que fallecieron presentaban meningitis. Estos hechos conllevan a replantearse la siguiente pregunta: ¿es la meningitis realmente un factor de “buen pronóstico” en la EM tal como se establece en los textos clásicos sobre esta enfermedad?.

Por otro lado, del análisis comparativo entre el grupo de supervivientes y el de fallecidos se encontró que en el grupo de pacientes fallecidos la media de cifra absoluta de neutrófilos y de plaquetas fue menor (8.060/18.547 y 100.714/222.603 respectivamente). Este hecho coincide con lo observado por Peters y cols²³⁷ en el que se describe la presencia de neutropenia severa precoz y trombocitopenia como factores de alto riesgo de desarrollar EM severa. No obstante, no se encontró diferencia considerable entre el valor absoluto de proteína C reactiva entre los pacientes fallecidos y los supervivientes, no existiendo datos suficientes para poder

analizar el papel de la procalcitonina como predictor específico de severidad de esta enfermedad.

La mortalidad por EM en nuestra serie se sitúa en el 4% mientras que otros trabajos reflejan una mortalidad mayor, entre el 8-23%^{108,236}. Este hecho podría explicarse teniendo en cuenta las distintas épocas en las que han sido llevado los distintos estudios. Nuestro trabajo es reflejo de una época donde el 90% de los niños están vacunados frente al meningococo C -el serogrupo con mayor letalidad- y el diagnóstico precoz y el traslado rápido de estos pacientes a los centros de 3º nivel así como una mayor concienciación de la población para el reconocimiento rápido de la enfermedad (aparición de petequias) hacen posible el inicio rápido del tratamiento.

Los pacientes que fallecieron precisaron mayores volúmenes de expansión y tratamiento inotrópico que los demás a pesar de lo cual el resultado fatal fue inevitable. Esto refleja que aquellos pacientes en los que la enfermedad meningocócica se presenta de manera más agresiva el curso evolutivo no puede modificarse a pesar de aplicar un tratamiento enérgico y precoz.

El serotipo de bacteria que más afectó a la población pediátrica española entre los años 2005 y 2008 fue el B. La mayoría de los casos estaban vacunados contra el meningococo C lo que ha erradicado prácticamente los casos de enfermedad por meningococo C en nuestro país. El meningococo B es que el más casos de enfermedad produce en el momento.

Tanto la escala MSSS de valoración de la gravedad de la sepsis meningocócica como la escala PRISM de riesgo de mortalidad en el paciente pediátrico predijeron de manera adecuada la evolución. Así los pacientes fallecidos presentaron un promedio de 6 puntos de la escala de MSSS al ingreso (lo que supone una tasa de mortalidad del 74%); por otro lado según la escala PRISM en los pacientes que fallecieron, el promedio fue de 40 lo cual representaba un riesgo de mortalidad del 98%. En función de nuestros datos, la escala PRISM tuvo una mejor capacidad predictiva que la escala MSSS, a pesar de no ser una escala específica de la enfermedad meningocócica. Una posible línea de trabajo, una vez identificados los factores más influyentes en el pronóstico de la EM, sería diseñar o adaptar la escala PRISM a la enfermedad meningocócica.

En España, al igual que en muchos otros países de nuestro entorno, existe más letalidad por serogrupo C que por serogrupo B. La tasa de defunciones por B en la temporada 05-06 fue la más alta de los últimos 7 años⁴¹. La información sobre el fenotipo (serotipo y sero-subtipo) de las cepas también es relevante en el momento actual aunque la información de la que dispusimos en nuestro estudio fue muy

limitada. Esto nos permitiría vigilar si aparecen cepas de serogrupos distintos al C con las características fenotípicas de éste (sugiriendo recombinación capsular debido a la presión de la vacuna sobre las cepas de serogrupo C) y detectar la emergencia de nuevas cepas virulentas. Si este fenómeno se produjera se incrementaría el número de cepas del grupo B con los sero-subtipos P1.5 o P1.2, 5, que son serotipos frecuentes en el serogrupo C. En nuestro país se ha observado un aumento significativo de las cepas B P1.5. Otro aspecto a tener en cuenta es el reemplazamiento clonal en las cepas del serogrupo C. En este sentido, se ha visto un incremento de las cepas de serotipo 2a que han desplazado a las 2b que fueron más frecuentes en la década de los años 90. Este reemplazamiento podría estar relacionado con mayor letalidad observada para este serogrupo.

8.2. POLIMORFISMOS GENÉTICOS COMO FACTORES DE RIESGO DE LA ENFERMEDAD MENINGÓCICA

Estudios recientes demuestran que ciertas alteraciones mitocondriales juegan un papel relevante en la patogénesis de ciertas enfermedades^{208,211,215,219,220,222}. Algunas variaciones en el genoma mitocondrial han sido identificadas como factores de riesgo de enfermedades complejas y multifactoriales.

La sepsis severa es un cuadro complejo, multifactorial y poligénico resultado de una interacción entre los factores genéticos del huésped, sus co-morbilidades (infecciones víricas simultáneas, defectos de la inmunidad,...), factores ambientales y los inherentes a la bacteria²³⁸. El estudio funcional del genoma es el responsable del mejor entendimiento de la gravedad y la predisposición de muchas enfermedades infecciosas²³⁹. En los últimos años se han llevado a cabo estudios que intentan correlacionar las variaciones genéticas de los individuos con el riesgo y pronóstico de la sepsis severa. Sin embargo, los resultados de dichos estudios han carecido de consistencia debido en parte a la heterogeneidad de los pacientes, los métodos de replicación empleados y la falta de reproducibilidad.

El presente estudio trata de analizar si existe alguna variación en el genoma mitocondrial que aumente la susceptibilidad a la EM. Inicialmente se llevó a cabo una estratificación poblacional para excluir los casos y/o controles que no eran españoles. Asimismo, fueron excluidos aquellos pacientes que no reportaron una ancestralidad europea o presentaban antepasados no europeos valorados éstos mediante los AIMS para los casos y el GC2. Estos criterios fueron aplicados rigurosamente en todos los pacientes con el fin de reducir al máximo posible el posible factor de confusión derivado de la estratificación poblacional.

El análisis llevado a cabo entre la cohorte de casos y el GC1 indicó que el polimorfismo **G11719A** estaba fuertemente relacionado con la susceptibilidad a la EM. Sin embargo, este resultado no pudo reproducirse en una segunda cohorte independiente de controles (GC2). Por otro lado, en este segundo análisis se encontró que otro posible SNPmt, el **A4769G**, como marcador de susceptibilidad, si bien, con un valor de significación estadística límite. Dicho hallazgo, a nuestro entender ambiguo, podría explicarse por dos razones. La primera es la presencia de 'ruido' derivado de la estratificación poblacional que no pudo detectarse con las técnicas empleadas en nuestro trabajo, puesto que los AIMS utilizados no fueron

diseñados originariamente para la detección de diferencias entre poblaciones europeas y por tanto serán aún menos eficientes para detectar patrones de variación en España. En la actualidad no existe un panel ideal para detectar la posible estratificación poblacional. La segunda razón es que posiblemente la detección de estratificación usando SNP autosómicos no es la mejor forma de detectar las variantes de SNPmt en los distintos grupos poblacionales. Por tanto, para detectar estratificación poblacional en un grupo homogéneo de individuos, como ocurre en la mayor parte del estado español, sería preciso emplear un panel de AIMS más sensible.

Nuestro trabajo revela que el ADNmt parece no tener un papel en el aumento de susceptibilidad a la EM así como su forma de presentación y pronóstico, al menos desde el punto de vista de los SNPsm y las poblaciones empleadas para tal fin. Sin embargo, en el presente podemos concluir que en los estudios de ADNmt existen evidencias más que suficientes para afirmar que pueden encontrarse asociaciones positivas derivadas de una muestra insuficiente o la presencia de estratificación poblacional no detectada.

A pesar de constituir la serie más larga de casos de EM estudiada desde el punto de vista genético, no fue posible recoger una segunda muestra de casos de EM debido a la baja prevalencia de la enfermedad. Por ello, consideramos necesario replicar la asociación surgida de la comparación de la cohorte de casos con el GC1 con otro grupo de controles (GC2). Sorpresivamente, en este segundo grupo no se encontraron evidencias de que nuestro mejor SNPmt (**G11719A**) no se asociaba con la enfermedad. Asimismo, la corrección del efecto no deseable derivado del uso de test múltiples en relación al incremento del error tipo I nos permitió además, descartar la falsa asociación también encontrada entre el haplogrupo U y el síndrome de distrés respiratorio tipo adulto. Por otro, este trabajo resalta también la importancia de detectar las posibles falsas asociaciones que pueden hallarse en los estudios de ADNmt.

Otros grupos^{222,226,240} también han estudiado la sepsis grave desde el punto de vista genético. En la década de los 90 se publicaron los primeros estudios que identificaron dos polimorfismos del gen del factor de necrosis tumoral, el cual se encuentra en el brazo corto del cromosoma 6, asociándolo a una mayor mortalidad en pacientes con sepsis grave o shock séptico. Recientemente Baudouin y cols¹⁶ estudiaron la posible asociación del haplogrupo H con la mortalidad en 150 pacientes que ingresaron en UCI con sepsis grave. Se genotiparon 542 controles sanos de la misma edad. Los autores observaron que la frecuencia de presentación del haplogrupo H no difería entre los pacientes con sepsis y la población control, por lo

que poseer dicho haplogrupo no parece ser un factor predisponente para el desarrollo de sepsis grave y el haplogrupo H es un factor independiente de mortalidad tardía (a los 180 días)¹⁶. La determinación de un único polimorfismo puede producir resultados discordantes por lo que algunos investigadores han realizado la determinación de haplogrupos (conjunto de alelos polimórficos que ocurren en un cromosoma) de un determinado gen, analizando su asociación con el pronóstico. Así se ha demostrado en 228 pacientes con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica que el haplotipo 174/G1753C/2954G de la IL-6 se asocia a una menor mortalidad que los restantes haplotipos de estos tres polimorfismos de un único nucleótido. De igual modo, se ha demostrado que el haplotipo -592C/734G/3367G del gen de la IL-10 se asocia a una mayor mortalidad en pacientes con sepsis, sólo cuando el origen es pulmonar, pero no en otros focos de infección¹⁶.

Las asociaciones espúreas pueden surgir de pequeñas estratificaciones poblacionales no identificadas, incluso habiendo filtrado aquellos pacientes con diferente ancestralidad. El riesgo de asociaciones falsamente positivas en los estudios de ADNmt debido al tamaño de la población efectiva es menor en los estudios de ADN autosómico, ya que además la variabilidad del ADNmt está profundamente estructurada en los grupos de población.

8.3. POSIBLES LIMITACIONES DE LOS ESTUDIOS GENÉTICOS DE ASOCIACIÓN

Los estudios de asociación genética intentan responder a la pregunta: ¿qué papel juega el componente genético de los individuos en el desarrollo, forma de presentación y pronóstico de las enfermedades?. En la figura 33 pueden observarse las fases llevadas a cabo en el desarrollo de estos estudios.

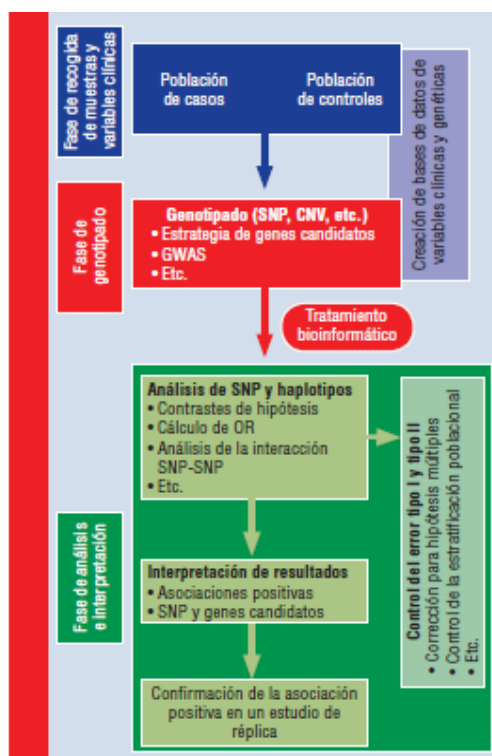


Figura 33. Fases de un estudio de asociación genética para el estudio de las enfermedades complejas. Adaptado de Salas y cols².

Se han señalado diferentes polimorfismos genéticos que podrían desempeñar un papel relevante en la susceptibilidad y el pronóstico del huésped^{5,11,60,62,71,74-76,79,89,238,241}. Sin embargo, estos resultados han sido inconsistentes a la hora de aportar conclusiones útiles. Esto puede ser atribuido en gran medida a la heterogeneidad de los pacientes seleccionados, los métodos empleados en la

selección de casos y controles, el tamaño muestral, la falta de estratificación poblacional y la variabilidad de agentes causales de la enfermedad^{2,242} (Ver figura 33). Si los casos y los controles no están bien recogidos y el número de ellos no es el adecuado, nos tendremos que enfrentar a problemas de interpretación. Por ejemplo, los casos y controles deben de pertenecer al mismo grupo poblacional, ya que de no ser así, es posible que determinadas variantes genéticas aparezcan como factores de riesgo cuando en realidad no tienen que ver con la enfermedad (falsos positivos)^{2,242}. También, la probabilidad de determinar con éxito una relación causal entre una variante genética y una enfermedad depende en gran medida del tamaño muestral: si la presunta asociación genética es débil, necesitaremos tamaños muestrales más grandes (del orden de varios cientos o miles de casos y controles)².

La estratificación poblacional se refiere a la existencia de grupos poblacionales con distintas características genéticas representando a nuestra muestra de casos y de controles. La estratificación poblacional se considera el “factor ruido” más importante en los estudios de asociación. Si los controles no son lo suficientemente representativos de la población de casos las asociaciones estadísticas surgen de manera espuria debido a las diferencias poblacionales. Sin embargo, la estratificación actúa de manera aleatoria en el conjunto de variables, y una manera de minimizar su efecto es replicar las asociaciones en un segundo grupo control, tal y como se ha hecho en el presente estudio. Existen otras maneras para monitorizar la estratificación, basadas fundamentalmente en el genotipado de SNPs (autosómicos) supuestamente neutros a la enfermedad, véase *Genomic Control*²⁴³, o los métodos basados en *Structure*^{244,245}. Sin embargo, es bien sabido en el campo de la genética de poblaciones humanas, que el genoma mitocondrial (al igual que otros marcadores de herencia estrictamente haplotípica como la parte no recombinantes del cromosoma Y), está fuertemente estratificado en las poblaciones. Por lo tanto, el uso de marcadores autosómicos es seguramente ineficaz para monitorizar la estratificación en estudios basados en ADNmt debido a su falta de sensibilidad. En nuestro estudio, se realizó un exhaustivo trabajo de estratificación poblacional de la muestra con el fin de eliminar la posibilidad de falsas asociaciones derivadas de este problema, según se muestra en la figura 32.

Un hecho contrastado es que a pesar de los muchos esfuerzos de genotipado, son muy pocas las variantes polimórficas de riesgo que se han podido replicar en estudios independientes. La estratificación poblacional es probablemente el mayor problema al que se enfrentan los estudios de asociación. Se ha mencionado anteriormente la necesidad de que los casos y los controles sean recogidos en el

mismo grupo poblacional. Cuando se lleva a cabo el análisis estadístico de los datos, a menudo estas diferencias poblacionales entre casos y controles que aparecen como asociadas a la enfermedad, sin tener ninguna relación con la patología, dando lugar a falsos positivos de asociación.

Los datos publicados en la literatura médica sugieren que algunos polimorfismos y/o mutaciones en algunos genes que codifican proteínas que intervienen en la cascada de la coagulación y la fibrinólisis podrían influir en la patogénesis de la sepsis severa y el shock séptico. Sin embargo, un SNP puede a su vez estar modulado por otro SNP y el conocimiento actual de estas interacciones es limitado. Por ejemplo, la interacción entre PAI-1 y el factor XIII ha mostrado que el efecto protector del factor XIII Leu34 desaparece cuando existen altas concentraciones de PAI-1 en plasma, lo cual ocurre en presencia del alelo PAI-1 4G²³⁸. La selección de las variables clínicas de la enfermedad que se deben de recoger en un estudio caso-control es importante ya que se podría encontrar asociación entre una variante genética y un aspecto concreto del comportamiento y la evolución de la enfermedad².

Entre las múltiples variables clínicas analizadas en el presente estudio, el distrés respiratorio tipo adulto se asoció fuertemente con el haplogrupo U (regresión logística multinomial, $p= 0,0025$), siendo por tanto el haplogrupo U un factor predictor del síndrome de distrés respiratorio tipo adulto (OR [95% CI] = 12.58 [2.41-64.93]). Sin embargo, esta asociación se perdió al ajustar el modelo mediante la corrección de Bonferroni y considerando todo el conjunto de hipótesis planteado en este estudio de asociación (e.j. número de SNPs, haplogrupos, etc). La corrección de Bonferroni para los test múltiples asume que todas las variables son contrastadas con la misma probabilidad de asociación sin tener en cuenta la influencia (correlación) de unas sobre otras. Ello conlleva a una “sobre-corrección”, es decir, riesgo de no detectar una posible asociación cuando ésta realmente existe (error tipo II). Otros métodos para corregir por múltiple test despejaron las dudas que podrían quedar sobre la no asociación del haplogrupo U en la EM.

La variabilidad mitocondrial está fuertemente estructurada en las poblaciones humanas, incluso en grupos poblacionales geográficamente cercanos y que comparten una ancestralidad común. Este es el caso de las poblaciones de la península Ibérica analizadas en el presente estudio, por ello los estudios caso-control realizados deben de utilizarse al menos dos grupos control que permitan evaluar de una manera más objetiva la posibilidad de que determinadas asociaciones estadísticas sean asociaciones espurias debido a estratificación poblacional. En el

caso de la enfermedad meningocócica, este ejercicio suple en gran medida las limitaciones que existen para recoger una segunda muestra de pacientes que pudiera servir de población de réplica, ya que es extremadamente complicado dada la baja prevalencia de la enfermedad.

9. CONCLUSIONES

“No basta con alcanzar la sabiduría, es necesario saber utilizarla”.

(Marco Tulio Cicerón)

1. El presente trabajo constituye el estudio más amplio y detallado, en cuanto a tamaño muestral y número de variables analizadas, llevado a cabo en el mundo sobre el conocimiento de las bases genéticas de la enfermedad meningocócica.
2. La enfermedad meningocócica se presenta con mayor prevalencia en la zona norte de la Península Ibérica aunque no hemos identificado factores genético-mitocondriales o ambientales que expliquen estas variaciones geográficas en la prevalencia de la enfermedad.
3. La sobre-representación de la variante del SNPmt **G11719A** hallada tras la comparación de los casos con el primer grupo control (GC1) no fue observada tras la comparación de los casos con un segundo grupo control (GC2), por lo que no puede establecerse asociación entre dicha variante y la enfermedad meningocócica.
4. El distrés respiratorio tipo adulto parecía estar asociado (valor nominal) con el **haplogrupo U**. No obstante, esta asociación se perdió al ajustar el análisis mediante la corrección de Bonferroni.
5. Dada la probabilidad de encontrar una falsa asociación positiva entre un determinado SNP y la enfermedad meningocócica, y a falta de una segunda/tercera cohorte de replicación/confirmación, dicha asociación debe ser al menos replicada en otros grupos control independientes.
6. Las asociaciones espurias pueden ocurrir con facilidad en los estudios de asociación debido a los problemas de estratificación poblacional no detectados. El riesgo de asociaciones falsamente positivas es mayor en los estudios de ADNmt dado que el tamaño efectivo de población es más bajo que en los estudios con ADN nuclear, lo que deriva en una mayor diferenciación inter-poblacional.
7. Son necesarios AIMS (ancestry informative markers) más sensibles para la estratificación estricta de grupos poblacionales limitados al territorio español.
8. Nuestro estudio excluye con rotundidad el sustrato genético mitocondrial de la enfermedad meningocócica y deja en entredicho las asociaciones previamente referidas en la literatura entre enfermedad bacteriana grave y ADN mitocondrial.

9. La forma clínica de presentación más frecuente es la púrpura siendo el rash petequiral la expresión clínica predominante. Dichas formas de expresión son significativamente más frecuentes en los pacientes con sepsis con/sin meningitis que en aquellos que sólo presentan meningitis.
10. La gran mayoría de los casos y *exitus* de enfermedad meningocócica que se producen en nuestro país son producidos por el serogrupo B.
11. No hemos identificado ningún marcador analítico -incluyendo reactantes de fase aguda como procalcitonina, proteína C reactiva y velocidad de sedimentación globular- que posea valor pronóstico.
12. No existen diferencias significativas en cuanto al tiempo medio entre la aparición de síntomas y signos (petequias) y el ingreso hospitalario entre los pacientes supervivientes y los *éxitus*. Si bien, el tiempo medio de estancia hospitalaria es significativamente menor entre los fallecidos ya que suelen hacerlo en las primeras 24 horas del ingreso.
13. El riesgo de secuelas en la enfermedad meningocócica es moderado en nuestro medio, siendo las más frecuentes las amputaciones y la necesidad de injertos cutáneos.
14. La tasa de mortalidad por enfermedad meningocócica en España es moderada y, en general, consecuencia de una disfunción orgánica múltiple.

10. PERSPECTIVAS FUTURAS

“El futuro pertenece a quienes creen en la belleza de sus sueños”.

(Eleanor Roosevelt)

El screening genético como herramienta de evaluación de factores de riesgo individual de una enfermedad infecciosa proporcionará una visión molecular de la interacción entre el patógeno y el huésped lo cual revelará nuevas dianas terapéuticas dirigidas al desarrollo de nuevos fármacos y vacunas. En la figura 34 se representa de manera esquemática las fases del conocimiento de las enfermedades. El mayor conocimiento de la medicina molecular generará un cambio en la práctica médica que basará sus tratamientos en mecanismos moleculares de la enfermedad infecciosa en vez de terapias empíricas.

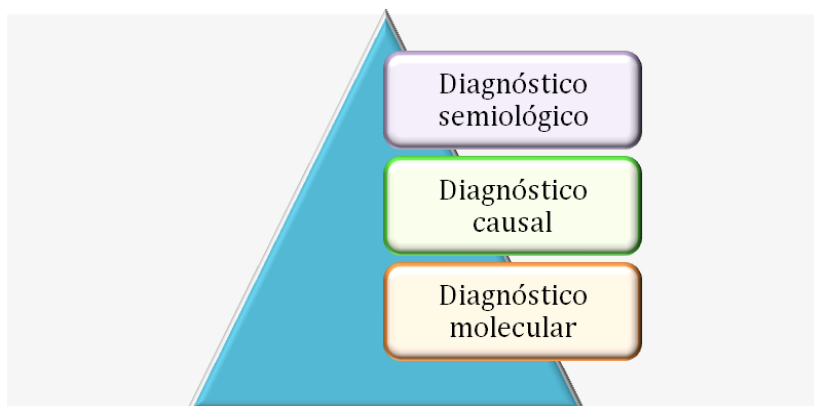


Figura 34. Evolución en el diagnóstico y el grado de conocimiento de las enfermedades.

El desarrollo de agentes inmunomoduladores de la respuesta inflamatoria constituye todavía hoy un reto y supone una línea prometedora de investigación de las bases inmunológicas de la enfermedad. El conocimiento de esta sofisticada fisiopatología permitirá llegar a suprimir los procesos nocivos y mantener activos aquellos que aportan beneficios en la lucha del huésped contra la infección.

Asimismo, el conocimiento de las características de la bacteria, su comportamiento en el huésped y la respuesta inflamatoria desencadenada permitirá desarrollar vacunas frente al meningococo B como se está realizando en la actualidad. El conocimiento de las variantes genéticas del huésped permitirá individualizar el tratamiento en base a las distintas formas de presentación de la enfermedad.

El presente trabajo constituye el estudio más amplio y detallado, en cuanto a tamaño muestral y número de variables analizadas, llevado a cabo en el mundo para el estudio de las bases genéticas de la enfermedad meningocócica hasta el momento actual. No obstante, dicho análisis recoge tan sólo el 60% de los casos de enfermedad meningocócica presentados durante el tiempo de estudio. Por tanto, tras una primera fase de creación de la red nacional para el estudio de la enfermedad meningocócica (ESIGEM - www.esigem.org) llevada a cabo a raíz de este proyecto, será necesaria una segunda fase de consolidación y mantenimiento de esta red con el fin de mantener activo el reclutamiento de casos e iniciar el abordaje de otros aspectos “ómicos” de la enfermedad meningocócica.

En esta misma línea, la red ESIGEM forma parte del Consorcio Internacional de Enfermedad Meningocócica, y lidera su red clínica y biobanco. Este consorcio ha puesto en marcha un proyecto de colaboración europea (EUCLIDS) cuyo objetivo principal es realizar un abordaje “wholeómico” de la enfermedad meningocócica, que incluya no sólo los aspectos genómicos, sino también metabólicos, transcriptómicos, o vacunómicos, entre otros (www.wholeomics.org). De entrada se realizará el análisis del genoma completo mediante un GWAS, con el fin de encontrar en el ADN nuclear posibles variables que se relacionen con un aumento de la susceptibilidad a la enfermedad meningocócica, el riesgo de mortalidad y/o las formas de presentación clínica.

Asimismo, a partir del presente estudio se desarrollarán distintos proyectos tales como: análisis de rutas (pathways), análisis de interacción génica (epistasia), mapeo fino de genes o rutas por (ultra)-secuenciación, réplica de los mejores SNPs candidatos en otras cohortes de equipos colaboradores, transcriptómica, interacción gen-gen host-microorganism.

Además, con el desarrollo de las nuevas vacunas proteicas frente a meningococo B, nuestra línea de trabajo podrá permitir la identificación de nuevas dianas de evaluación de la eficacia de las mismas, así como mejorar el conocimiento de la relación microorganismo-huesped, antígeno vacunal-huesped.

Nuestro trabajo de investigación ha logrado un avance en el conocimiento de la enfermedad meningocócica describiendo el comportamiento de la enfermedad en nuestro país y acercándose a comprender mejor su fisiopatología estudiando la respuesta del huésped desde un punto de vista de la genética mitocondrial. Éste ha sido el punto de partida de futuras investigaciones que ayudarán a entender la compleja interacción entre la bacteria, el medioambiente y el huésped, inicialmente

centrado en la enfermedad meningocócica, pero seguramente extrapolable a otros modelos de enfermedad bacteriana grave. En ello estamos, por ello apostamos.

11. BIBLIOGRAFÍA

“No es preciso tener mucho libros, sino tener los buenos”.

(Lucio Anneo Séneca)

1. Kleijn E, Hazelzet J, Kornelisse R, de Groot R. Pathophysiology of meningococcal sepsis in children. *Eur J Pediatr* 1998;157:869-80.
2. Salas A, Marcos-Alonso S, Vega A, Fachal L, Martínón-Torres F, ESIGEM Gdl. La genómica al servicio de la Pediatría en el estudio de la enfermedad multifactorial. *Acta Pediatr Esp* 2010;68:6-12.
3. Sánchez Tarragó N. Enfermedad meningocócica: Incidencia y distribución mundial en los últimos años. *Reporte técnico de vigilancia* 2000;5:1-14.
4. Rosenstein N, Perkins B, Stephens D, Popovic T, Hughes J. Meningococcal disease. *N Engl J Med* 2001;344:1378-88.
5. Emonts M, Hazelzet JA, Groot de R, Hermans. Host genetic determinants of *Neisseria meningitidis* infections. *lancet infectious disease* 2003;3:565-77.
6. Cooke GS, Hill AV. Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat Rev Genet* 2001;2:967-77.
7. Casselbrant M, Mandel E, Jung J, et al. Otitis media: a genome-wide linkage scan with evidence of susceptibility loci within the 17q12 and 10q22.3 regions. *BMC Med Genet* 2009;10:85.
8. Genuneit J, Cantelmo J, Weinmayr G, et al. A multi-centre study of candidate genes for wheeze and allergy: the international Study of Asthma and Allergies in Childhood Phase 2. *Clin Exp Allergy* 2009;39:1875-88.
9. Steck A, Bugawan T, Valdes A, et al. Association of non-HLA genes with type 1 diabetes autoimmunity. *Diabetes* 2005;54:2482-6.
10. Wapenaar M, Monsuur A, Poell J, et al. The SPINK gene family and gene family and celiac disease susceptibility. *Immunogenetics* 2007;59:349-57.
11. Balding J, Healy C M, Livingstone W J, et al. Genomic polymorphic profiles in an Irish population with meningococcaemia: is it possible to predict severity and outcome of disease? *Genes Immun* 2003;4:533-40.
12. Charpentier J, Mira JP. [Role of host response during severe bacterial infection]. *Arch Pediatr* 2001;8 Suppl 4:689s-96s.
13. Blackwell C, Jonsdottir K, Hanson M, Todd W, Chaudhuri A, Mathew B. Non secretion of ABO antigens predisposing to infection by *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*. *Lancet* 1986;2:284-5.
14. Callaghan M, Rockett K, Banner C, et al. Haplotypic diversity in human CEACAM genes: effects on susceptibility to meningococcal disease. *Genes Immun* 2008;9:30-7.

15. Chiche J, Siami S, Dhainaut J, Mira J. Cytokine Polymorphisms and Susceptibility to Severe Infectious Diseases. *Sepsis* 2001;4:209-15.
16. Baudouin S, Saunders D, Tiangyou W, et al. Mitochondrial DNA and survival after sepsis: a prospective study. *Lancet* 2005;366:2118-21.
17. Anderson TJ. Cancer and mitochondrial DNA. *Br Med J* 1969;3:593.
18. Mosquera-Miguel A, Alvarez-Iglesias V, Carracedo A, et al. Is mitochondrial DNA variation associated with sporadic breast cancer risk? *Cancer Res* 2008;68:623-5.
19. Harrison L, Pass M, Mendelson A, et al. Invasive Meningococcal Disease in Adolescents and Young Adults. *JAMA* 2001;286:694-9.
20. Gestal Otero J. Enfermedad Meningocócica. Capítulo 46. 10ª ed. Madrid: Elsevier España; 2001.
21. Vieusseux M. Memoire sur la maladie qui a regné a geneve au printemps de 1805. *J Med Chir Pharmacol* 1805;11:163.
22. Marchiafava E, Celli A. Spru i micrococchi della meningite cerebrospinale epidemica Gazz degli Ospedali 1884;5:59.
23. Weichselbaum A. Ueber di Aetiologie der akuten Meingitis cerebrospinalis *Fortschr Med* 1887;5:573-83.
24. Manchanda V, Gupta S, Bhalla P. Meningococcal disease: History, epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, antimicrobial susceptibility and prevention. *Indian J Med Microbiol* 2006;24:7-19.
25. Flexner S. The results of serum treatment in thirteen hundred cases of epidemic meningitis. *J Exp Med* 1913;17:553-76.
26. Stephens D. Uncloaking the meningococcus: dynamics of carriage and disease. *Lancet* 1999;353:941-2.
27. Yazdankhah S, Caugant D. Neisseria meningitidis: an overview of the carriage state. *J Med Microb* 2004;53:821-32.
28. Schwartz B, Moore P, Broome C. Global epidemiology of meningococcal disease. *Clin Microbiol Rev* 1989;2:5118-24.
29. World Health Organization WG. Control of epidemic meningococcal disease: WHO practical guidelines. Edition Foundation Marcel Merieux 1995.
30. Connolly M, Noah N. Is group C meningococcal disease increasing in Europe? A report of surveillance of meningococcal infection in Europe 1993-6. *Epidemiol Infect* 1999;122:41-9.
31. Stephens D. Conquering the Meningococcus. *FEMS Microbiology Reviews* 2007;31:3-14.

32. Popovic T, Sacchi C, Reeves M, et al. *Neisseria Meningitidis* serogroup W135 isolates associated with the ET 37 complex. *Emerg Infect Dis* 2000;6:428-9.
33. Taha M, Achtman M, Alonso J, et al. Serogroup W135 meningococcal disease in Hajj pilgrims. *Lancet* 2000;356:2159.
34. Vogel G. Infectious disease. Shortage of meningitis vaccine forces triage in Burkina Faso. *Science* 2003;299:1499-501.
35. Boisier P, Nicolas P, Djibo S, Taha M, Jeanne I, Mainassara H. Meningococcal meningitis: unprecedented incidence of serogroup X related cases in 2006 in Niger. *Clin Infect Dis* 2007;44:657-63.
36. Scholten R, Poolman J, Valkenburg H, Bijlmer H, Dankert J, Caugant D. Phenotypic and genotypic changes in a new clone complex of *Neisseria meningitidis* causing disease in The Netherlands, 1958-1990. *J Infect Dis* 1994;169:673-6.
37. Greenwood B, Bradley A, Wall R. Meningococcal disease and season in sub-Saharan Africa. *Lancet* 1985;2:829-30.
38. Vázquez J. Situación actual de la epidemiología de la enfermedad meningocócica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006;24 Supl:14-8.
39. Alcalá B, Salcedo C, Arreaza L, Berrón S, de la Fuente L, Vázquez A. The epidemic wave of meningococcal disease in Spain in 1996-1997: probably a consequence of strain displacement. *J Med Microbiol* 2002;51:1102-6.
40. Ministerio SyC. Situación actual de la enfermedad meningocócica en España. Modificación de la pauta de vacunación frente meningitis C. 2005.
41. Ministerio dSyC. Enfermedad meningocócica en España. Análisis de la temporada 2005-2006. . *Boletín Epidemiológico* 2007;15.
42. Pollard A. Global Epidemiology of Meningococcal Disease and Vaccine Efficacy. *Pediatric Infect Dis J* 2004;23:S274-S9.
43. Stephens D, Greenwood B, Brandtzaeg P. Epidemic meningitis, meningococcaemia, *neisseria meningitidis*. *Lancet* 2007;369:2196-210.
44. Carrol E, Thompson A, Hart A. New Therapies and vaccines for meningococcal disease. *Expert Opin Investig Drugs* 2001;10:1487-500.
45. Swartley J, Marfin A, Edupuganti S, et al. Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:271-6.
46. Kvalsvig A, Unsworth D. The immunopathogenesis of meningococcal disease. *J Clin Pathol* 2003;56:417-22.
47. Thomson M, Connor S, Ward N, Molyneux D. Impact of Climate Variability on Infectious Disease in West Africa. *EcoHealth Journal Consortium* 2004;1:138-50.

48. Molesworth A, Cuevas L, Connor S, Morse A, Thompson M. Environmental risk and meningitis epidemics in Africa. *Emerging Infectious Diseases* 2003;9:1287-92.
49. Young L, LaForce F, Head J, Feeley J, Bennet J. A simultaneous outbreak of meningococcal and influenza infections. *N Engl J Med* 1972;287:5-9.
50. Moore P, Hierholzer J, DeWitt W. Respiratory viruses and mycoplasma as cofactors for epidemic group A meningococcal meningitidis. *JAMA* 1990;264:1271-5.
51. Cartwright K, Jones D, Smith A, Stuart J, Kaczmarek E, Palmer S. Influenza A and meningococcal disease. *Lancet* 1991;338:554-7.
52. Dunlop K, Coyle P, Jackson P, Patterson C, Shields M. Respiratory viruses do not trigger meningococcal disease in children. *Journal of Infection* 2006.
53. Tinsley C, Nassif X. Meningococcal pathogenesis: at the boundary between the pre- and post-genomic eras. *Curr Opin in Microbiology* 2001;4:47-52.
54. Coen P, Tully J, Stuart J, Ashby D, Viner R, Booy R. Is it exposure to cigarette smoke or to smokers which increases the risk of meningococcal disease teenagers? *Int J Epidemiol* 2006;35:330-6.
55. Lee CM, NA, Howie S, Ezzati M. Association of secondhand smoke exposure with pediatric invasive bacterial disease and bacterial carriage: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 2010;7:e1000374.
56. Faber J, Meyer C, Gemmer C, Russo A, Finn A, Murdoch C. Human toll-like receptor 4 mutations are associated with susceptibility to invasive meningococcal disease in infancy. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25:80-1.
57. Smirnova I, Hamblin M, McBride C, Di Rienzo A. Excess of rare amino acid polymorphisms in the Toll-like receptor 4 in humans. *Genetics* 2001;158:1657-64.
58. Smirnova N, Dols A, Derkx H, Hibberd M, Levin M. Assay of locus-specific genetic load implicates rare toll-like receptor 4 mutations in meningococcal susceptibility. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;10:6075-80.
59. Faber J, Henninger N, Finn A, Zenz W, Zepp F, Knuf M. A toll like receptor 4 variant is associated with fatal outcome in children with invasive meningococcal disease. *Acta Paediatr* 2009;98:548-52.
60. Read R, Pullin J, Gregory S, Borrow R, Kaczmarek E, di Giovine F. A functional polymorphism of toll like receptor 4 is not associated with likelihood or severity of meningococcal disease. *J Infect Dis* 2001;184:640-2.

61. Sjolinder H, Mogensen T, Kilian M, Jonsson A, Paludan S. Important role for Toll like receptor 9 in host defense against meningococcal sepsis. *Infect Immun* 2008;76:5421-8.
62. Wright V, Hibberd M, Levin M. Genetic polymorphisms in host response to meningococcal infection: The role of susceptibility and severity genes. *Vaccine* 2009;27:B90-B102.
63. Bols A, Janssens J, Peetermans W, Stevens E, Bobbaers H. Recurrent meningococcal infections in a patient with congenital C5 deficiency. *Clin Microbiol Rev* 1993;21:519-37.
64. Figueroa J, Densen P. Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:359-95.
65. Fijen C, Kuijper E, Hannema A, Sjolholm A, van Putten J. Complement deficiencies in patients over ten years old with meningococcal disease due to uncommon serogroups. *Lancet* 1989;2:585-8.
66. Hibberd M, Sumiya M, Summerfield J, Booy R, Levin M, Group MR. Association of variants of the gene for mannose-binding lectin with susceptibility to meningococcal disease. *Lancet* 1999;353:1049-53.
67. Fijen C, Derkx B, Kuijper E, Mannens M, Poort S, Peters M. Fulminant meningococcal septic shock in a boy with combined inherited properdin and protein c deficiency. *Clin Exp Immunol* 1995;102:290-6.
68. Sjolholm A, Braconier J, Soderstrom C. Properdin deficiency in a family with fulminant meningococcal infections. *Clin Exp Immunol* 1982;50:291-7.
69. Spath P, Sjolholm A, Fredrikson G, et al. Properdin deficiency in a large Swiss family: identification of a stop codon in the properdin gene, and association of meningococcal disease with lack of the IgG2 allotype marker G2m(n). *Clin Exp Immunol* 1999;118:278-84.
70. Sprong T, Roos D, Weemaes C, et al. Deficient alternative complement pathway activation due to factor D deficiency by 2 novel mutations in the complement factor D gene in a family with meningococcal infections. *Blood* 2006;107:4865-70.
71. Haralambous E, Dolly S, Hibberd M, et al. Factor H, a regulator of complement activity, is a major determinant of meningococcal disease susceptibility in UK Caucasian patients. *Scand J Infect Dis* 2006;38:764-71.
72. Schneider M, Prosser B, Caesar J, et al. *Neisseria meningitidis* recruits factor H using protein mimicry of host carbohydrates. *Nature* 2009;458:890-3.

73. Jack D, Cole J, Naylor R, et al. Genetic polymorphism of the binding domain of surfactant protein -A2 increases susceptibility to meningococcal disease. *Clin Infect Dis* 2006;43:1426-33.
74. Bredius R, Derkx B, Fijen C, et al. Fc gamma receptor IIa (CD32) polymorphism in fulminant meningococcal septic shock in children. *J Infect Dis* 1994;170:848-53.
75. Platonov A, Shipulin G, Vershinina I, Dankert J, van de Winkel J, Kuijper E. Association of human Fc gamma RIIa (CD32) polymorphism with susceptibility to and severity of meningococcal disease. *Clin Infect Dis* 1998;27:746-50.
76. Smith I, Vedeler C, Halstensen. FcγRIIa and FcγRIIb polymorphisms were not associated with meningococcal disease in Western Norway. *Epidemiol Infect* 2003;130:193-9.
77. Powars D, Larsen R, Johnson J, et al. Epidemic meningococemia and purpura fulminans with induced protein C deficiency. *Clin Infect Dis* 1993;17:254-61.
78. Kondaveeti S, Hibberd M, Levin M. The insertion/deletion polymorphism in the t-PA gene does not significantly affect outcome of meningococcal disease. *Thromb Haemost* 1999;82:161-62.
79. Haralambous E, Hibberd M, Hermans N, Ninis S, Nadel S, Levin M. Role of functional plasminogen-activator-inhibitor-1 4G/5G promoter polymorphism in susceptibility, severity, and outcome of meningococcal disease in Caucasian children. *Crit Care Med* 2003;31:2788-93.
80. Westendorp R, Hottenga J, Slagboom P. Variation in plasminogen-activator-inhibitor-1 gene and risk of meningococcal septic shock. *Lancet* 1999;31:2788-93.
81. Geishofer G, Binder A, Müller M, et al. 4G/5G promoter polymorphism in the plasminogen-activator-inhibitor-1 gene in children with systemic meningococcaemia. *Eur J Pediatr* 2005;164:486-90.
82. Hermans P, Hibberd M, Booy R, et al. 4G/5G promoter polymorphism in the plasminogen-activator-inhibitor-1 gene and outcome of meningococcal septic shock. *Lancet* 1999;354:556-60.
83. Binder A, Endler G, Müller M, Mannhalter C, Zenz W, Group EMS. 4G4G genotype of the plasminogen activator inhibitor-1 promoter polymorphism associates with disseminated intravascular coagulation in children with systemic meningococemia. *J Thromb Haemost* 2007;5:2049-54.
84. Brandtzaeg P, Sandset P, Joo G, Ovstebo R, Abildgaard U, Kierulf P. The quantitative association of plasma endotoxin, antithrombin, protein C, extrinsic

- pathway inhibitor and fibrinopeptide A in systemic meningococcal disease. *Thromb Res* 1989;55:459-70.
85. Booy R, Nadel S, Hibberd M, Levin M, Newport M. Genetic influence on cytokine production in meningococcal disease. *Lancet* 1997;349:1176.
 86. Nadel S, Newport M, Booy R, Levin M. Variation in the tumour necrosis factor alpha gene promoter region may be associated with death from meningococcal disease. *J Infect Dis* 1996;174:878-80.
 87. Westendorp R, Langermans J, Huizinga T, et al. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet* 1997;349:170-3.
 88. Read R, Cannings C, Naylor S, et al. Variation within Genes Encoding Interleukin-1 and the Interleukin-1 Receptor Antagonist Influence the Severity of Meningococcal Disease. *Ann Intern Med* 2003;138:534-41.
 89. Endler G, Marculescu R, Starkl P, et al. Polymorphism in the Interleukin-1 Gene Cluster in Children and Young Adults with Systemic Meningococemia. *Clinical Chemistry* 2006;52:511-4.
 90. Pathan N, Williams J, Oragui E, Stephens A, Levin M. Changes in the interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor axis in meningococcal septic shock. *Crit Care Med* 2005;33:1839-44.
 91. Westendorp R, Langermans J, de Bel C, et al. Release of tumor necrosis factor: an innate host characteristic that may contribute to the outcome of meningococcal disease. *Lancet* 1995;171:1057-60.
 92. Hubacek JA, Stuber F, Frohlich D, al. E. Gene variants of the bactericidal/permeability increasing protein and lipopolysaccharide binding protein in sepsis patients: gender-specific genetic predisposition to sepsis. *Crit Care Med* 2001;29:557-61.
 93. Levin M, Quint P, Goldstein B, et al. Recombinant bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI21) as adjunctive treatment for children with severe meningococcal sepsis: a randomised trial. rBPI21 Meningococcal Sepsis Study Group *Lancet* 2000;356:961-7.
 94. Danser A, Schalekamp M, Bax W, Et a. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. *Circulation* 1995;92:1387-88.
 95. Cougant D, Maiden M. Meningococcal carriage and disease-Population biology and evolution *Vaccine* 2009;27S:B64-B70.
 96. Lo H, Tang CM, Exley R. Mechanisms of avoidance of host immunity by *Neisseria meningitidis* and its effect on vaccine development. *Lancet Infect Dis* 2009;9:418-27.

97. Hackett S, Thomson A, Hart C. Cytokines, chemokines and other effector molecules involved in meningococcal disease. *J Med Microb* 2001;50:847-59.
98. Hazelzet J, Kornelisse R, van der Pouw-Kraan T, et al. Interleukin-12 levels during the initial phase of septic shock with purpura in children: relation to severity of disease. *Cytokine* 1997;9:711-6.
99. van Deuren M, Brandtzaeg P, van der Mer J. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:144-66.
100. Brandtzaeg P, Mollnes T, Kierulf P. Complement activation and endotoxin levels in systemic meningococcal disease. *J Infect Dis* 1989;159:195-204.
101. Densen P. Complement deficiencies and meningococcal disease. *Clin Exp Immunol* 1991;86:57-62.
102. Hack C, Ogilvie A, Eisele B, Eerenberg A, Wagstaff J, Thijs L. C1-inhibitor substitution therapy in septic shock and in the vascular leak syndrome induced by high doses of interleukin-2. *Intensive Care Med* 1993;119:519-28.
103. Churchwell K, McManus M, Kent P, et al. Intensive blood and plasma exchange for treatment of coagulopathy in meningococemia. *J Clin Apher* 1995;10:171-7.
104. Thiru Y, Pathan N, Bignall S, Habibi P, Levin M. A myocardial cytotoxic process is involved in the cardiac dysfunction of meningococcal septic shock. *Crit Care Med* 2000;28:2979-83.
105. Barquet N, Gasser I, Domingo P, Moraga F, Macaya A, Elcuaz R. Primary meningococcal conjunctivitis: report of 21 patients and review. *Rev Infect Dis* 1990;12:838-47.
106. Schaad U. Arthritis in disease due to *Neisseria Meningitidis*. *Rev Infect Dis* 1980;2:880-8.
107. Hahné S, Charlett A, Purcell B, et al. Effectiveness of antibiotics given before admission in reducing mortality from meningococcal disease: systematic review. *BMJ* 2006;332:1299.
108. Hart C, Thomson A. Meningococcal disease and its management in children. *BMJ* 2006;333:685-90.
109. Pollard A, Britto J, Nadel S, DeMunter C, Habibi P, Levin M. Emergency management of meningococcal disease. *Arch Dis Child* 1999;80:290-6.
110. Strang J, Pugh E. Meningococcal infections: reducing the case fatality rate by giving penicillin before admission to hospital. *BMJ* 1992;305:141-3.

111. Berkowitz F, Vallabh P, Altman D, Diamantes F, Van Wyk H, Stroucken J. Jarisch-Herxheimer reaction in meningococcal meningitis. *Am J Dis Child* 1983;137:599.
112. Hurley J. Antibiotic-induced release of endotoxin: a reappraisal. *Clin Infect Dis* 1992;15:840-54.
113. Prins J, Speelman P, Kuijper E, Dankert J, van de Deventer S. No increase in endotoxin release during antibiotic killing of meningococci. *J Antimicrob Chemother* 1997;39:13-8.
114. Brandtzaeg P, Kierulf P, Gaustad P, et al. Plasma endotoxin as a predictor of multiple organ failure and death in systemic meningococcal disease. *J Infect Dis* 1989;159:195-204.
115. Cartwright K, Reilly S, White D, Stuart J. Early treatment with parenteral penicillin in meningococcal disease. *BMJ* 1992;305:143-7.
116. García Muñoz M, Espinosa Pérez J, Franganillo Fernández A, Cerezo Pancorbo J, Sanchez Badia J. Tratamiento antibiótico previo en la infección meningocócica [Previous antibiotic treatment in meningococcal infection]. *An Esp Pediatr* 1986;24:213-6.
117. Harnden A, Ninis N, Thomson M, et al. Parenteral penicillin for children with meningococcal disease before hospital admission: case-control study. *BMJ* 2006;332:1295-7.
118. Soult- Rubio J, Muñoz-Saez M. Enfermedad meningocócica invasora. *An Pediatr (Barc)* 2005;62:297-303.
119. Pecoul B, Varaine F, Keita M, et al. Long-acting chloramphenicol versus intravenous ampicillin for treatment of bacterial meningitis *Lancet* 1991;338:862-6.
120. Vázquez J, Enriquez R, Abad R, Alcalá B, Salcedo C, Arraeza L. Antibiotic resistant meningococci in Europe: Any need to act? *FEMS Microbiol Rev* 2006;31:64-70.
121. Dager S, Llor J, Benayoun M, Beaufile F. Approche thérapeutique en 2003 du choc septique de l'enfant dans les deux premières heures (à l'exclusion du nouveau-né). *Arch Pediatr* 2004;11:1014-17.
122. Carcillo J, Davis A, Zaritsky A. Role of early fluid resuscitation in pediatric septic shock. *JAMA* 1991;266:1242-5.
123. Nadel S, Kroll S. Diagnosis and management of meningococcal disease: the need for centralized care. *FEMS Microbiol Rev* 2007;31:71-83.
124. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001;345:1368-77.

125. Carcillo J, Fields A. Clinical practice parameters for hemodynamic support of pediatric and neonatal patients in septic shock *Crit Care Med* 2002;30:1365-78.
126. Singhi S, Singhi P, Srinivas B, et al. Fluid restriction does not improve the outcome of acute meningitis. *Pediatric Infect Dis J* 1995;14:495-503.
127. Nadel S, De Munter C, Britto J, Levin M, Habibi P. Albumin: saint or sinner. *Arch Dis Child* 1998;79:384-5.
128. Cochrane Injuries Group Albumin R. Human albumin administration in critically ill patients: systematic review of randomised controlled trials. *BMJ* 1998;317:235-40.
129. Butt W. Septic Shock. *Pediatr Clin North Am* 2001;48:601-25.
130. Boucek M, Boerth R, Artman M, Graham T, Boucek R. Myocardial dysfunction in children with acute meningococemia. *J Pediatr* 1984;105:538-42.
131. Monsalve F, Rucabado L, Salvador A, Bonastre J, Cuñat J, Ruano M. Myocardial depression in septic shock caused by meningococcal infection. *Crit Care Med* 1984;12:1021-3.
132. Vincent J-L, Roman A, Kahn R. Dobutamine administration in septic shock: addition to a standard protocol. *Crit Care Med* 1990;18:689-93.
133. Leclerc F, Noizet O, Dorkenoo A, et al. Traitement du purpura fulminans méningococcique. *Arch Pédiatr* 2001;8:677-88.
134. Van Woensel J, Biezeveld M, Alders A, et al. Adrenocorticotropic Hormone and Cortisol Levels in Relation to Inflammatory Response and Disease Severity in Children with Meningococcal Disease. *J Infect Dis* 2001;184:1532-7.
135. Casado Flores J, Blanco Quirós A. Sepsis meningocócica y shock séptico: Medidas eficaces, tratamientos controvertidos. *An Esp Pediatr* 1999;50:346-52.
136. Bollaert P, Charpentier C, Levy B, Debouverie M, Audibert G, Larcarn A. Reversal of late septic shock with supraphysiologic doses of hydrocortisone. *Crit Care Med* 1998;26:645-50.
137. Pathan N, Faust S, Levin M. Pathophysiology of meningococcal meningitis and septicaemia. *Arch Dis Child* 2003;88:601-7.
138. Bone R, Fisher C, Clemmer T, Slotman G, Metz C, Balk R. A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 1987;317:653-8.
139. Lefering R, Neugebauer E. Steroid controversy in sepsis and septic shock: a meta-analysis *Crit Care Med* 1995;23:1294-303.

140. Annane D, Bellissant E, Bollaert P, Briegel J, Keh D, Kupfer Y. Corticosteroids for severe sepsis and septic shock: a systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2004;329:480-8.
141. Branco R, Russell R. Should steroids be used in children with meningococcal shock? *Arch Dis Child* 2005;90:1195-6.
142. Baines P. Severe meningococcal disease in childhood. *Br J Anesth* 2003;90:72-83.
143. Cocchi P, Silenzi M, Calabri G, Salvi G. Naloxone in fulminant meningococemia. *Pediatric Infect Dis J* 1984;3:187.
144. Martínón J, Franco A, García J, et al. Naloxone hydrochloride in the therapy of endotoxic shock following meningococcal disease. Initial results *An Esp Pediatr* 1982;17:457-60.
145. Giroir B, Scannon P, Levin M. Bactericidal/permeability-increasing protein-Lessons learned from the phase III, randomized, clinical trial of rBPI21 for adjunctive treatment of children with severe meningococemia. *Crit Care Med* 2001;29:S130-S5.
146. Derkx B, Wittes J, McCloskey R. Randomized placebo-controlled trial of HA-1A, a human monoclonal anti-endotoxin antibody, in children with meningococcal septic shock. *Eur J Pediatr* 1999;154:735-8.
147. Group JS. Treatment of severe infectious purpura in children with human plasma from donors immunized with *Escherichia coli* J5: a prospective double-blind study. *J Infect Dis* 1992;165:695-701.
148. Lynn W, Cohen J. Adjunctive therapy for septic shock: a review of experimental approaches. *Clin Infect Dis* 1995;20:143-58.
149. Alberio L, Lammle B, Esmon C. Protein C Replacement in Severe Meningococemia: Rationale and Clinical Experience. *Clin Infect Dis* 2001;32:1338-46.
150. Shorr A, Bernard G, Dhainaut J, et al. Protein C concentrations in severe sepsis: an early directional change in plasma levels predicts outcome. *Crit Care* 2006;10:R92.
151. Macias W, Nelson D. Severe protein C deficiency predicts early death in severe sepsis. *Crit Care Med* 2004;32:223-8.
152. Kleijn E, De Groot R, Hack C, et al. Activation of protein C following infusion of protein C concentrate in children with severe meningococcal sepsis and purpura fulminans: A randomized, double-blinded, placebo-controlled, dose-finding study. *Crit Care Med* 2003;31:1839-47.

153. Vincent J-L, Nadel S, Kutsogiannis D, et al. Drotrecogin alfa (activated) in patients with severe sepsis presenting with purpura fulminans, meningitis, or meningococcal disease: a retrospective analysis of patients enrolled in recent clinical studies. *Crit Care* 2005;9:R331-43.
154. Nadel S, Goldstein B, Williams M, et al. Drotrecogin alfa (activated) in children with severe sepsis a multicentre phase III randomised controlled trial. *Lancet* 2007;369:836-43.
155. Martí-Carvajal A, Salanti G, Cardona A. Human recombinant activated protein C for severe sepsis. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;(1):CD004388.
156. Fourrier F, Lestavel P, Chopin C, et al. Meningococemia and purpura fulminans in adults: acute deficiencies of protein C and S and early treatment with antithrombin III concentrates. *Intensive Care Med* 1990;16:121-4.
157. Cobcroft R, Herderson A. Meningococcal purpura fulminans treated with antithrombin III concentrate: what is the optimal replacement therapy? *Aust NZ J Med* 1994;24:575-6.
158. Zenz W, Zoehrer B, Levin M, et al. Use of recombinant tissue plasminogen activator in children with meningococcal purpura fulminans: a retrospective study. *Crit Care Med* 2004;32:1806-7.
159. De Chalain T, Cohen S, Burnstein F. Successful use of leeches in the treatment of purpura fulminans. *Ann Plast Surg* 1995;35:300-6.
160. Dippenaar R, Smith J, Goussard P, Walters E. Meningococcal purpura fulminans treated with medicinal leeches. *Pediatric Critical Care Medicine* 2006;7:476-8.
161. Dippenaar R, Smith J, Goussard P, Walters E. Meningococcal purpura fulminans treated with medicinal leeches. *Pediatr Crit Care Med* 2006;7:476-8.
162. Nolan J, Sinclair R. Review of management of purpura fulminans and two case reports. *Br J Anesth* 2001;86:581-6.
163. Lawrence C, Matthew J, Cox N. The effect of ketanserin on healing of fresh surgical wounds. *Br J Dermatol* 1995;132:580-6.
164. Van Deuren M, Santman F, van Dalen R, Sauerwein R, Span L, van der Mer J. Plasma and whole blood exchange in meningococcal sepsis. *Clin Infect Dis* 1992;15:424-30.
165. Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo E. Plasma exchange and haemofiltration in fulminant meningococcal sepsis. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:484-87.
166. Bjorvatn B, Bjertnaes L, Fadnes H, et al. Meningococcal septicaemia treated with combined plasmapheresis and leucapheresis or with blood exchange. *Br Med J Clin Res Ed* 1984;288:439-41.

167. Van Deuren M. Extracorporeal techniques to accelerate the clearance of TNF- α and IL-1 β in septic patients. In J.L. Vincent (ed), Yearbook of intensive care and emergency medicine. Springer Verlag KG, Berlin, Germany. 1997;140-47.
168. Smith O, White D, Vaughan D, Rafferty M, Claffey LL, B, Casey W. Use of protein-C concentrate, heparin, and haemodiafiltration in meningococcus-induced purpura fulminans. *Lancet* 1997;350:1590-3.
169. Kuppermann N, Inkelis S, Saladino R. The role of heparin in the prevention of extremity and digit necrosis in meningococcal purpura fulminans. *Pediatric Infect Dis J* 1994;13:867-73.
170. Huang S, Clarke J. Severe skin loss after meningococcal septicaemia: complications in treatment. *Acta Paediatr* 1997;86:1263-6.
171. Hudson S, Goddard E, Millar K. The management of skin infarction after meningococcal septicaemia in children. *Br J Plast Surg* 1993;46:242-6.
172. Jansen P, Pixley R, Brouwner M, et al. Inhibition of factor XII in septic baboons attenuates the activation of complement and fibrinolytic systems and reduces the release of interleukin-6 and neutrophil elastase. *Blood* 1996;87:2337-44.
173. Aiuto L, Barone S, Cohen P, Boxer R. Recombinant tissue plasminogen activator restores perfusion in meningococcal purpura fulminans. *Crit Care Med* 1997;25:1079-82.
174. Nadel S, De Munter C, Britto J, Habibi P, Levin M. Recombinant tissue plasminogen activation restores perfusion in meningococcal purpura fulminans. *Crit Care Med* 1998;26:971-3.
175. Duncan A. New therapies for severe meningococcal disease but better outcomes? *Lancet* 1997;350:1565-6.
176. Stewart F, McClure B, Mayne E. Successful treatment of neonatal purpura fulminans with epoprostenol. *J R Soc Med* 1991;84:623-4.
177. Irazuzta J, McManus M. Use of topically applied nitroglycerin in the treatment of purpura fulminans. *J Pediatr* 1990;117:993-5.
178. Waisman D, Shupak A, Weisz G, Melamed Y. Hyperbaric Oxygen Therapy in the Pediatric Patient: The Experience of the Israel Naval Medical Institute. *Pediatrics* 1998;102:1-9.
179. Leclerc F, Leteurtre S, Cremer R, Fourier C, Sadik A. Do new strategies in meningococemia produce better outcomes? *Crit Care Med* 2000;28:S60-S3.
180. Goldman A, Kerr S, Butt W, et al. Extracorporeal support for intractable cardiorespiratory failure due to meningococcal disease. *Lancet* 1997;349:466-9.

181. Leclerc F, Martinot A, Cremer R, Fourier C. ECMO for refractory cardiorespiratory failure due to meningococcal disease. *Lancet* 1997;349:1397-98.
182. Quagliarello V, Scheld W. Treatment of bacterial meningitis. *N Engl J Med* 1997;87:1360-66.
183. Schaad U, Kaplan S, McCracken G. Steroid therapy for bacterial meningitis. *Clin Infect Dis* 1995;20:685-90.
184. Rennick G, Shann F, de Campo J. Cerebral herniation during bacterial meningitis in children. *Br Med J* 1993;306:953-55.
185. Bröker M, Fantoni S. Meningococcal disease: a review on available vaccines and vaccines in development. *Minerva Med* 2007;98:575-89.
186. Girard M, Preziosi M, Aguado M, Kieny M. A review of vaccine research and development: Meningococcal disease. *Vaccine* 2006;24:4692-700.
187. Jódar L, Feavers I, Salisbury D, Granoff D. Development of vaccines against meningococcal disease. *Lancet* 2002;359:1499-508.
188. Zimmer S, Stephens D. Meningococcal conjugate vaccines. *Expert Opinion Pharmacother* 2004;5:855-63.
189. Alonso JM, Bertherat E, Perea W, et al. From genomics to surveillance, prevention and control: new challenges for the African meningitis belt. *Vaccine* 2006;24:4279-84.
190. Alonso J, Bertherat E, Perea W, et al. From genomics to surveillance, prevention and control: new challenges for the African meningitis belt. *Bull Soc Pathol Exot* 2006;99:404-8.
191. Gardner P. Prevention of Meningococcal Disease. *N Engl J Med* 2005;355:1466-73.
192. Bernardini G, Braconi D, Martelli P, Santucci A. Postgenomics of *Neisseria meningitidis* for vaccines development. *Expert Rev Proteomics* 2007;4:667-77.
193. De Wals P. Meningococcal C Vaccines. The Canadian Experience. *Pediatr Infect Dis J* 2004;12:S280-S4.
194. Danzig L. Meningococcal disease. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:S285-S92.
195. Cartwright K, Morris R, Rumke H, et al. Immunogenicity and reactogenicity in UK infants of a novel meningococcal vesicle vaccine containing multiple class 1 (PorA) outer membrane proteins. *Vaccine* 1999;17:2612-19.
196. de Kleijn E, van Eijndhoven L, Vermont C, et al. Serum bactericidal activity and isotype distribution of antibodies in toddlers and schoolchildren after vaccination with RIVM hexavalent PorA vesicle vaccine. *Vaccine* 2001;20:353-8.

197. Leclerc F, Leteurtre S, Cremer R, Fourier C, Sadik A. Do new strategies in meningococemia produce better outcomes? *Crit Care Med* 2000;28:S60-S3.
198. Lala H, Mills G, Barrat K, Bonning J, Manikkan N, Martin D. Meningococcal disease and the frequency of antibiotic administration delays. *J infect* 2006;2:Pendiente de salir impreso, disponible on line.
199. Wang V, Malley R, Fleisher G, Inkelis S, Kuppermann N. Antibiotic Treatment of Children With Unsuspected Meningococcal Disease. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2000;154:556-60.
200. Theilen U, Wilson L, Wilson G, Beattie J, Qureshi S, Simpson D. Management of invasive meningococcal disease in children and young people: summary of SIGN guidelines *BMJ* 2008;336:1367-70.
201. Thompson a, Thompson. *Genética en Medicina*. 2001.
202. Garnacho Montero J, Garnacho Montero C. Polimorfismos del ADN mitocondrial y mortalidad en la sepsis. ¿Hemos hallado la aguja en el pajar? *Med Intensiva* 2007;31:184-6.
203. Lightowlers RN, Jacobs HT, Kajander OA. Mitochondrial DNA--all things bad? *Trends Genet* 1999;15:91-3.
204. Chinnery PF, Thorburn DR, Samuels DC, et al. The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both? *Trends Genet* 2000;16:500-5.
205. Chomyn A, Attardi G. MtDNA mutations in aging and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304:519-29.
206. Solano A, Playán A, López-Pérez M, Montoya J. Genetic diseases of the mitochondrial DNA in humans. *Salud Publica Mex* 2001;43:151-61.
207. Attardi G. Role of mitochondrial DNA in human aging. *Mitochondrion* 2002;2:27-37.
208. Fliss M, Usadel H, Caballero O, et al. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. *Science* 2000;287:2017-9.
209. Leonard J, Schapira A. Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial DNA defects. *Lancet* 2000;355:299-304.
210. Schapira A. Mitochondrial disorders. *Curr Opin Neurol* 2000;13:527-32.
211. Wallace D. Mitochondrial DNA sequences variation in human evolution and disease. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:8739-46.
212. Wallace D, Stugard C, Murdock D, Schurr T, Brown M. Ancient mtDNA sequences in the human nuclear genome: a potential source of errors in identifying pathogenic mutations. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:14900-5.

213. Melov S, Coskun P, Wallace D. Mouse models of mitochondrial disease, oxidative stress and senescence. *Mutat Res* 1999;434:233-42.
214. Habano W, Sugai T, Nakamura S, et al. Reduced expression and loss of heterozygosity of the SDHS gene in colorectal and gastric cancer. *Oncol Rep* 2003;10:1375-80.
215. Polyak K, Li Y, Zhu H, et al. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. *Nat Genet* 1998;20:291-3.
216. Bandelt H. Mosaics of ancient mitochondrial DNA: positive indicators of nonauthenticity. *Eur J Hum Genet* 2005;13:1106-12.
217. Mitchell A, Elson J, Howell N, Taylor R, Turnbull D. Sequence variation in mitochondrial complex I genes: mutation or polymorphism? *J Med Genet* 2006;43:175-9.
218. Yao Y, Salas A, Bravi C, Bandelt H. A reappraisal of complete mtDNA variation in East Asian families with hearing impairment. *Hum Genet* 2006;119:505-15.
219. Carelli V, Giordano C, d'Amati G. Pathogenic expression of homoplasmic mtDNA mutations needs a complex nuclear-mitochondrial interaction. *Trends Genet* 2003;19:257-62.
220. Hirai F, Aoyama H, Ohtoshi M, Kawashima S, Ozawa K, Tobe T. Significance of mitochondrial enhancement in hepatic energy metabolism in relation to alterations in hemodynamics in septic pigs with severe peritonitis *Eur Surg Res* 1984;16:148-55.
221. Simonson S, Welty-Wolf K, Huang Y, et al. Altered mitochondrial redox responses in gram negative septic shock in primates. *Circ Shock* 1994;43:34-43.
222. Singer M, Brealey D. Mitochondrial dysfunction in sepsis. *Biochem Soc Symp* 1999;66:149-66.
223. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, et al. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* 2002;360:219-23.
224. Minamiyama Y, Takemura S, Koyama K, Yu H, Miyamoto M, Inoue M. Dynamic aspects of glutathione and nitric oxide metabolism in endotoxemic rats. *Am J Physiol* 1996;271:G575-81.
225. Corbucci GG, Gasparetto A, Candiani A, et al. Shock-induced damage to mitochondrial function and some cellular antioxidant mechanisms in humans. *Circ Shock* 1985;15:15-26.
226. Yang Y, Shou Z, Zhang P, et al. Mitochondrial DNA haplogroup R predicts survival advantage in severe sepsis in the Han population. *Genet Med* 2008;10:187-92.

227. Gauderman W. Sample size requirements for matched case-control studies of genes environment interaction. *Stat Med* 2002;21:35-50.
228. American, Academy, Pediatrics. Red Book 2009: Report of the Committee on Infectious Diseases. 28 ed. Elk Grove Village, IL; 2006.
229. Rickham P. Human experimentation. Code of ethics of the world medical association. Declaration of Helsinki. *Br Med J* 1964;2:177.
230. Salas A, Quintans B, Alvarez-Iglesias V. SNaPshot typing of mitochondrial DNA coding region variants. *Methods Mol Biol* 2005;297:197-208.
231. Bandelt A, Achilli A, Kong Q, et al. Low "penetrance" of phylogenetic knowledge in mitochondrial disease studies. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;333:122-30.
232. Quintáns B, Alvarez-Iglesias V, Salas A, Phillips C, Lareu MV, Carracedo A. Typing of mitochondrial DNA coding region SNPs of forensic and anthropological interest using SNaPshot minisequencing. *Forensic Sci Int* 2004;140:251-7.
233. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Statist Soc Ser* 1995;57:289-300.
234. Mosquera-Miguel A, Álvarez-Iglesias V, Vega A, et al. Is mitochondrial DNA variation associated with sporadic breast cancer risk? *Cancer Res* 2008;68:623-5.
235. Quintans B, Álvarez-Iglesias V, Salas A, Phillips C, Lareu MV, Carracedo A. Typing of mitochondrial DNA coding region SNPs of forensic and anthropological interest using SNaPshot minisequencing. *Forensic Sci Int* 2004;140:251-7.
236. Thompson M, Ninis N, Perera R, et al. Clinical recognition of meningococcal disease in children and adolescents. *Lancet* 2006;367:397-403.
237. Peters M, Ross-Russell R, White D, et al. Early severe neutropenia and thrombocytopenia identifies the highest risk cases of severe meningococcal disease. *Pediatr Crit Care Med* 2001;2:225-31.
238. Texereau J, Frédéric P, Chiche J, Rousseau C, Mira J. Importance of hemostatic gene polymorphisms for susceptibility to and outcome of severe sepsis. *Crit Care Med* 2004;32:S313-9.
239. Cariou A, Chiche J, Charpentier J, Dhainaut J, Mira J. The era of genomics: Impact on sepsis clinical trial design. *Crit Care Med* 2003;30:S341-S8.
240. Peng J, Yang L, Yang F, et al. Characterization of ST-4821 complex, a unique *Neisseria meningitidis* clone. *Genomics* 2008;91:78-87.
241. Vermont C, De Groot R, Hazelzet J. Bench-to-bedside review: Genetic influences on meningococcal disease. *Crit Care* 2002;6:60-5.

242. Campbell H, Rudan I. Interpretación of genetic association studies in complex disease. *The Pharmacogenomics Journal* 2002;2:249-360.
243. Devlin B, Roeder K. Genomic Control for Association Studies. *Biometrics* 1999;55:997-1004.
244. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 2000;155:945-59.
245. Rosenberg NA, Pritchard JK, Weber JL, et al. Genetic Structure of Human Populations. *Science* 2002;298:2381-5.
246. Farron F, Cheseaux J, Pelet B. Chronic meningococemia and IgA deficiency in a adolescent. *Arch Pediatr* 1996;3:149-51.
247. Harrison L, Jolley K, Shutt K, et al. Antigenic shift and increased incidence of meningococcal disease. *J Infect Dis* 2006;193:1266-74.
248. Zenz W, Zoehrer B, Levin M, et al. Use of recombinant tissue plasminogen activator in children with meningococcal purpura fulminans: a retrospective study. *Crit Care Med* 2004;32:1777-80.
249. Kleijn E, de Groot R, Hack E, et al. Activation of protein C following infusion of protein C concentrate in children with severe meningococcal sepsis and purpura fulminans: A randomized, double-blinded, placebo-controlled, dose-finding study. *Crit Care Med* 2003;31:1839 -47.
250. Veldman A, Ehrenberg A, Jäger G, Ettingshausen C, Schneider W, Kreuz W. Is Recombinant Tissue Plasminogen Activator an Option in the Treatment of Meningococcus-Induced Purpura? *Crit Care Med* 2000;28:598-9.
251. Leclerc F, Cremer R, Leteurtre S, Martinot A, Fourier C. Protein C Concentrate and Recombinant Tissue Plasminogen Activator in Meningococcal Septic Shock. *Crit Care Med* 2000;28:1694-96.
252. Alejandria M, Lansang M, Dans L, Mantaring J. Intravenous immunoglobulin for treating sepsis and septic shock. . *Cochrane Database Syst Rev* 2000;2.
253. Lopez-Herce Cid J, Bustinza Arriortua A, Alcaraz Romero A, Brandstrup Azuero K, Fernandez Garcia-Abril C, Rocero Rubio M. Treatment of septic shock with continuous plasmfiltration and hemofiltration. *An Pediatr* 2003;59:491-6.
254. Lewis M. Venovenous haemodiafiltration in meningococcal septicaemia. *Lancet* 1996;347:612-3.
255. Wiedermann C. Clinical review: molecular mechanisms underlying the role of antithrombin in sepsis. *Crit Care* 2006;10:209.
256. Sánchez Santos L, Couceiro Ganzo J, Blanco Fernández P, Rodríguez Núñez A, Martínón Sánchez J. Usefulness of plasminogen activating factor in meningococcal sepsis. *An Esp Pediatr* 1997;47:327-8.

257. Zenz W, Muntean W, Gallistl S, Zobel G, Grubbauer H. Recombinant tissue plasminogen activator treatment in two infants with fulminant meningococemia. *Pediatrics* 1995;96:144-8.
258. Heyderman R, Klein N, Shennan G, Levin M. Deficiency of prostacyclin production in meningococcal shock. *Arch Dis Child* 1991;66:1296-9.
259. Cohen J. Meningococcal disease as a model to evaluate novel anti-sepsis strategies. *Crit Care Med* 2000;28:S64-S7.
260. Opal S, Cohen J. Are the fundamental differences of clinical relevance between Gram-positive and Gram-negative bacterial sepsis? *Crit Care Med* 1999;27:1608-16.

ANEXO I

“Si una persona es perseverante, aunque sea dura de entendimiento, se hará inteligente; y aunque sea débil se transformará en fuerte”.

(Leonardo Da Vinci).

A. Protocolo de recogida de datos.



**Complejo Hospitalario
Universitario de
Santiago de Compostela**

Protocolo ESIGEM Formulario Recogida Datos

Instrucciones de cumplimentación y envío del formulario:

- Por favor rellene con la máxima precisión el cuestionario en TODOS sus apartados.
- Utilice los menús desplegables, y consulte los apéndices cuando sea necesario.
- Una vez cumplimentado el protocolo guarde el archivo con el nombre "código de su centro-- número paciente-primer apellido paciente-segundo apellido paciente" (ejemplo: 001-003-Perez-Sanchez)
- Una vez completado, enviar a la dirección federicomartinon@telefonica.net o fedemartinon@movistar.com. Gracias.

Código del hospital:

Protocolo nº:

Prospectivo o Retrospectivo: -----

Nº de historia del paciente:

Nombre médico que cumplimenta protocolo:

Datos generales y de filiación genética del paciente:

Sexo: --

Raza/Etnia/Grupo poblacional:----- Nivel socioeconómico:-----

Fecha de Nacimiento (dd/mm/aaaa):

Edad (años y meses):

Localidad origen: Provincia:

Localidad (probable) de contagio: Provincia:

Diagnóstico(*ver apéndice pág 6 a 9):-----

Grado de seguridad diagnóstica (*ver apéndice pág. 6 a 9): -----

Localidad (Provincia) de nacimiento niño:

Localidad (Provincia) de nacimiento padre:

Localidad (Provincia) de nacimiento madre:

Localidad (Provincia) de nacimiento abuelo paterno:

Localidad (Provincia) de nacimiento abuela paterna:

Localidad (Provincia) de nacimiento abuelo materno:

Localidad (Provincia) de nacimiento abuela materna:

Fecha ingreso en hospital (dd/mm/aaaa):

Tiempo de evolución desde inicio cuadro hasta el ingreso (horas):



**Complexo Hospitalario
Universitario de
Santiago de Compostela**

Protocolo ESIGEM Formulario Recogida Datos

Tiempo de evolución desde la aparición de las primeras lesiones cutáneas hasta el ingreso (horas):

Ingresó en UCIP: Sí No

Duración estancia en UCIP (días) [especificar decimales, especialmente en el caso de estancias menores de 24 horas, ejemplo 18 horas=0,75 días]

Duración estancia hospitalaria total (días): [especificar decimales, especialmente en el caso de estancias menores de 24 horas, ejemplo 12 horas=0,5]

Fecha de Alta / Exitus: (formato dd/mm/aa)

Si procede – especificar causa del exitus (especificar):

Estado al alta UCIP: ----

Estado al alta hospital ----

Estado a los 30 días ----

Estado a los 90 días ----

Antecedentes del paciente

Familiares en 1º o 2º grado con:

- Enfermedad meningocócica --
- Meningitis --
- Inmunodeficiencia congénita o adquirida -- (especificar si procede):
- Enfermedad hereditaria: -- (especificar si procede)
- Otros (especificar):

Antecedentes personales de:

- Meningitis bacteriana --
- Otras infecciones graves que requiriesen ingreso --
- Inmunodeficiencia congénita o adquirida: -- (especificar si procede):
- Tratamiento con inmunosupresores: -- (especificar si procede):

¿Vacunado frente a meningococo? --

Recibió tratamiento antibiótico previo al ingreso:--

- Si procede especificar cual y durante cuántos días

Datos microbiológicos

Visualización de diplococo gram negativo (meningococo): -----

Pruebas rápidas - detección de antígenos polisacáridos de meningococo:

Detección de ADN de Neisseria Meningitidis en sangre o LCR -----



**Complejo Hospitalario
Universitario de
Santiago de Compostela**

Protocolo ESIGEM Formulario Recogida Datos

Aislamiento de Neisseria Meningitidis en:[se pueden señalar varios]:

No aislado Sangre, LCR, Petequias, otro (Especificar)

Serogrupo aislado: -- Serotipo aislado: Serosubtipo:

MIC (concentración mínima inhibitoria) penicilina: MIC cefotaxima:

Serología de N meningitidis: -----

Diagnósticos [Ver anexo para definiciones – pags 6 a 9]

Diagnóstico clínico: ----- Meningitis meningocócica: ---

Disfunción cardiovascular: -- Disfunción neurológica --

Oligoanuria --: Disfunción renal --

Disfunción respiratoria -- Lesión pulmonar aguda --

SDRA -- Disfunción hematológica --

Coagulación intravascular diseminada -- Disfunción hepática --

Otros (gastrointestinal, cardiológico, especificar):

Datos clínicos:

Púrpura -- : Lesión predominante: -----

- Extensión (Porcentaje de superficie corporal afectada por alguna lesión petequeal/equimótica/hemorrágica):

Compromiso vascular distal -- Especificar a continuación:

- Localización (Señalar la/s que correspondan):
 - MSD -- , gravedad(*): .., nivel [**]: ...
 - MSI -- , gravedad(*): .., nivel [**]: ...
 - MID -- , gravedad(*): .., nivel [**]: ...
 - MII -- , gravedad(*): .., nivel [**]: ...

• *Gravedad de 1 a 10: (impresión clínica graduada de 1-leve a 10-necrosis posiblemente irreversible)

• **Nivel: limite de extensión máxima compromiso vascular distal (dedos, mano, muñeca, antebrazo, brazo)

Hipotensión refractaria durante las dos primeras horas: --

Puntuación en la escala de coma de Glasgow (ver apéndice pags 11 y 12):

- Al ingreso:
- Peor registrado (a las horas):

PRISM (Pediatric Risk of Mortality score) * calcular con los peores valores registrados en las primeras **24 horas** o hasta que el paciente fallece si lo hace antes de 24 horas:

*(ver apéndice pag 13 o calcular online en: <http://www.sfar.org/scores2/prism2.html>)



**Complejo Hospitalario
Universitario de
Santiago de Compostela**

Protocolo ESIGEM Formulario Recogida Datos

Puntuación en el score Castellanos/MSSS * *calcular con los peores valores registrados en las primeras 2 horas del ingreso en UCIP:* *(ver apéndice pag. 14 o calcular online en: <http://www.sfar.org/scores2/msss2.html>)

Datos analíticos (peores registrados en las primeras 24 horas de ingreso):

Nº total de leucocitos (cel/mm ³):	Porcentaje de cayados (%):	
Nº total de plaquetas:	pH	
pCO ₂ (mmHg)	Exceso de bases (mmol/L):	
Bicarbonato (mmol/L)	Láctico sérico (mg/dl):	
PaO ₂ arterial /FiO ₂ :	Potasio (meq/l):	
Calcio (mg/dl):	Glucosa (mg/dl):	
Troponina (ng/ml):	CK (U/L):	
CK-MB (U/L):	Creatinina (mg/dl):	
Urea (mg/dl):	Fibrinógeno (mg/dl):	
Tiempo de protrombina (TP o Quick) (en segundos):	(en %):	INR:
Tiempo de tromboplastina (TTP) (en segundos):	(en %):	
Productos de degradación de fibrinógeno (PDF) (microgr/ml):		
Dímero D (nanogr/ml):	Antitrombina III (%):	
Proteína C (%) (si disponible):	Proteína S (%) (si disponible):	
Procalcitonina (ng/ml):	Proteína C reactiva:	
VSG 1ª hora (mm):	Análisis LCR (nº células):	
Cortisol:	ACTH:	

Datos sobre el tratamiento

Expansores plasmáticos en las primeras 2 horas --

Aminas -- :

- Noradrenalina -- dosis máxima (microgr/kg/min)
- Dopamina -- dosis máxima (microgr/kg/min)
- Dobutamina -- dosis máxima (microgr/kg/min)
- Adrenalina -- dosis máxima (microgr/kg/min)
- Fenilefrina -- dosis máxima (microgr/kg/min)
- Milrinona -- dosis máxima (microgr/kg/min)

Duración total en días de tratamiento vasopresor:



**Complejo Hospitalario
Universitario de
Santiago de Compostela**

Protocolo ESIGEM Formulario Recogida Datos

Derivados sanguíneos: [se puede señalar más de uno]:

- plasma fresco concentrado hematies concentrado plaquetas
 inmunoglobulina inespecífica otros (especificar) .

Antibióticos [se puede señalar más de uno]

- cefotaxima ceftriaxona vancomicina teicoplanina
 meropenem otros (especificar):

Soporte respiratorio

- NO oxigenoterapia VNI intubación y ventilación asistida

Si estuvo intubado, duración de la intubación (días):

Corticoides: -- Terlipresina -- RTPA: --

Anticoagulantes naturales [se puede señalar más de uno]

- Proteína C Proteína C activada antitrombina III otros

Hemofiltración -- -- Duración (días)

Plasmafiltración -- Nº ciclos: volumen total de plasma intercambiado (litros):

Otros tratamientos (especificar):

Datos evolución / pronóstico:

Escala pronóstica Glasgow (Ver apéndice pag 15):

Al alta: A los 3 meses: A los 6 meses:

Escala de rendimiento global (POPC) (Ver apéndice pag 15):

Al alta: A los 3 meses: A los 6 meses:

Precisó o precisará injertos cutáneos -- -- especificar % superficie corporal:

Presenta amputaciones -- -- Especificar localización y nivel de amputación (ejemplo:

MSD: 2 falanges terminales, 1 falange proximal; MII pierna tercio distal...

- MSD --, especificar:
- MSI --, especificar:
- MID --, especificar:
- MII --, especificar:

Observaciones, Comentarios y Sugerencias:



Protocolo ESIGEM ANEXOS Recogida Datos

ANEXOS

Definiciones de SIRS/sepsis/shock(*):

(*)Goldstein et al. *Pediatr Crit Care Med* 2005;6:2-8

- **Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS):** Al menos cumplirá 2 de los siguientes cuatro criterios, y uno de los cuales debe ser necesariamente el 1º o el 2º
 1. Temperatura central $>38,5^{\circ}\text{C}$ o $< 36^{\circ}\text{C}$
 2. Leucocitosis, leucopenia, o desviación izquierda para la edad (en general $>12.000/\text{mm}^3$, $<4000 \text{ mm}^3$ o $>10\%$, respectivamente)
 3. Taquicardia: frecuencia cardíaca dos desviaciones estándar por encima de lo normal para la edad en ausencia de estímulos externos, drogas o estímulos dolorosos, frecuencia persistentemente elevada entre 3 minutos y 4 horas, y no explicable de otra manera; o en niños de menos de 1 año bradicardia (frecuencia por debajo del percentil 10 para la edad en ausencia de drogas o estímulos vagales, o enfermedad cardíaca congénita) o disminución persistente al menos 30 minutos no explicable de otro modo.
 4. Frecuencia respiratoria 2 desviaciones estándar por encima de la correspondiente a la edad, o ventilación mecánica por un proceso agudo no relacionado con la enfermedad neuromuscular subyacente o la realización de anestesia general.
- **Sospecha de infección:** Síndrome clínico altamente sugestivo de infección por los hallazgos en el examen clínico y/o las pruebas complementarias
 - Petequias y/o púrpura con inestabilidad hemodinámica
 - Fiebre, tos, hipoxemia, leucocitosis e infiltrados pulmonares
 - Abdomen distendido timpánico, fiebre y leucocitosis, perforación intestinal



Complejo Hospitalario
Universitario de
Santiago de Compostela

Protocolo ESIGEM ANEXOS Recogida Datos

- **Disfunción neurológica:** Puntaje en la escala de Glasgow ≤ 11 o cambio agudo en el puntaje de Glasgow ≥ 3 puntos con respecto al puntaje basal.
- **Disfunción hematológica:** Plaquetopenia (< 80.000 plaquetas/ mm^3 o descenso del 50% con respecto al valor más alto registrado en los tres días previos), o INR > 2 .
- **Disfunción renal:** Creatinina sérica más de dos veces por encima del límite normal para la edad, o incremento dos veces por encima del valor basal
- **Disfunción hepática:** Bilirrubina total ≥ 4 mg/dl, ó GOT/ALT dos veces por encima del límite normal para la edad.
- **Lesión pulmonar aguda:** $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 \leq 300$, con infiltrados bilaterales, de instauración aguda y en ausencia de fracaso cardíaco izquierdo.
- **Síndrome de distrés respiratorio agudo:** $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 < 200$, con infiltrados bilaterales, de instauración aguda y en ausencia de fracaso cardíaco izquierdo.
- **Hipotensión refractaria:** Hipotensión arterial sistólica (por debajo percentil 5 o dos desviaciones estándar para la edad) que no se normaliza en las primeras dos horas del ingreso en UCIP a pesar de un tratamiento óptimo con volumen (> 40 ml/kg) y drogas vasoactivas.



Complexo Hospitalario
Universitario de
Santiago de Compostela

Protocolo ESIGEM ANEXOS Recogida Datos

Percentil 5 y 95 de constantes vitales según edad

(*)Goldstein et al. *Pediatr Crit Care Med* 2005;6:2-8

	Taquicardia (lpm)	Bradicardia (lpm)	Taquipnea (rpm)	Leucocitosis Leucopenia ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Tensión arterial sistólica
1mes-1 año	>180	< 90	>34	>17.5 o <5	<75
2-5 años	>140	---	>22	>15.5 o <6	<74
6-12 años	>130	---	>18	>13.5 o <4.5	<83
13-18 años	>110	---	>14	>11 o <4.5	<90



**Complexo Hospitalario
Universitario de
Santiago de Compostela**

Protocolo ESIGEM ANEXOS Recogida Datos

Escala de coma de Glasgow

ACTIVIDAD	MEJOR RESPUESTA
Apertura de Ojos:	
Espontánea:	4
Al hablarle:	3
Al dolor:	2
Ausencia:	1
Verbal:	
Orientado:	5
Confuso:	4
Palabras inadecuadas:	3
Sonidos inespecíficos:	2
Ausencia:	1
Motora:	
Obedece órdenes:	6
Localiza dolor:	5
Retirada al dolor:	4
Flexión al dolor:	3
Extensión anormal:	2
Ausencia:	1

Dirección Postal: Hospital Clínico Universitario-Transferencia Choupana, s/n-15706 Santiago. T: 981 950 000-Fax: 981 950 454-CIF: Q1500295E - Hospital G.I. Choupana- Transferencia Choupana, s/n- T: 981 950 000-15706 Santiago - Hospital de Comorbidade Bacter. s/n- T: 981 1300-Fax: 981 1330-15706 Santiago. - Hospital Psiquiátrico-Plaza San Nemesio, 2- T: 981 1500-Fax: 981 1511-15706 Santiago.



Complejo Hospitalario
Universitario de
Santiago de Compostela

Protocolo ESIGEM ANEXOS Recogida Datos

Escala de coma de Glasgow Modificada para Lactantes

<u>ACTIVIDAD</u>	<u>MEJOR RESPUESTA</u>
<u>Apertura de Ojos:</u>	
Espontánea:	4
Al hablarle:	3
Al dolor:	2
Ausencia:	1
<u>Verbal:</u>	
Baluceo:	5
Irritable:	4
Llanto al dolor:	3
Quejidos al dolor:	2
Ausencia:.....	1
<u>Motora:</u>	
Movimientos espontaneos.....	6
Retirada al tocar:	5
Retirada al dolor:	4
Flexión anormal:	3
Extensión anormal:	2
Ausencia:	1

Dirección Postal: Hospital Clínico Universitario Traxelas Chaves, s/n. 15706 Santiago. Tel. 981 960 000 Fax. 981 960 454 CITE: O1002056E - Hospital GI Chaves, Traxelas Chaves, s/n. Tel. 981 960 000-15706 Santiago -
 Hospital de Coma-RR Ramón Baltar, s/n. Tel. 981 961 000 Fax. 981 531 235-15706 Santiago... Hospital Psiquiátrico RMarín Herms, 2,1 tel. 981 961 900 Fax. 981 1 901-15706 Santiago



Complejo Hospitalario
Universitario de
Santiago de Compostela

Protocolo ESIGEM ANEXOS Recogida Datos

Pediatric Risk of Mortality Score (PRISM) *

*Puede calcularlo online en: <http://www.sfar.org/scores2/prism2.html>

	< 1 año	TODOS	> 1 año	Puntaje
TAS (mm Hg)	130-160		150-200	2
	55-65		65-75	2
	> 160		> 200	6
	40-54		50-64	6
	< 40		<50	7
TAD (mm Hg)		> 110		6
Frecuencia cardíaca (lpm)	> 160		> 150	4
	< 90		< 80	4
Frecuencia respiratoria (rpm)	61-90		51-70	1
	> 90		> 70	5
	Apnea		Apnea	5
PaO₂/FiO₂		200-300		2
		< 200		3
PaCO₂ (mmHg)		51-65		1
		> 65		5
Glasgow		< 8		6
Reacción pupilar		anisocoria/midriasis fijas y midriáticas		4
				10
TP/TPT		> 1,5 veces/control		2
Bilirrubina total (mg/dl)		> 3,5 en > 1 mes		6
Potasio (mEq/l)		3-3,5		1
		6,5-7,5		1
		< 3		5
		> 7,5		5
Calcio (mg/dl)		7-8		2
		12-15		2
		< 7		6
		> 15		6
Glucosa (mg/dl)		40-60		4
		250-400		4
		< 40		8
		> 400		8
Bicarbonato (mEq/l)		< 16		3
		> 32		3

Dirección Psiquiátrica: Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, s/n, 15706 Santiago, Tel. 981 690 000 Fax: 981 690 444 C.F.R.: O11020206E - Hospital O3 Chusquea, Avenida Chusquea, s/n, Tel. 981 690 000 Fax: 981 690 15706 Santiago - Hospital de Compostela: Hospital de Compostela, s/n, 15706 Santiago, Tel. 981 151 1000 Fax: 981 151 2565-15706 Santiago - Hospital Psiquiátrico: P. Martín Henares, 2, 15101 Santiago, Tel. 981 151 3000 Fax: 981 151 90115706 Santiago





Complejo Hospitalario
Universitario de
Santiago de Compostela

Protocolo ESIGEM ANEXOS Recogida Datos

Score Castellanos – MSSS (menigococcal septic shock score)*

*Utilizar los peores valores registrados en las primeras 2 horas del ingreso en UCIP. Puede calcularlo online en: <http://www.sfar.org/scores2/msss2.html>

	SI	NO
Hipotensión refractaria*	2	0
Exceso de bases > 10 mmol/L	1	0
Glasgow < 8	2	0
Leucocitos < 4000/mm ³	1	0
Tiempo de tromboplastina (TTP) > 150%	1	0
Cianosis	2	0
Oliguria*	1	0

Definiciones(*)

- **Hipotension:** Presencia de hipotensión (TAS < 75 mmHg en niños menores de 4 años, y < 85 mmHg en niños mayores de 4 años) en las primeras 2 horas del ingreso a pesar de una resucitación líquida adecuada (carga de líquido > 20 ml / kg) y tratamiento con dopamina o dobutamina > 5 µg/kg.min o con adrenalina o noradrenalina > 0.1 µg/kg.min.
- **Oliguria:** diuresis < 1 mL/kg.h durante al menos una hora.

Interpretación de la escala:

- Riesgo débil (≤ 3)
- Riesgo intermedio (4-5)
- Riesgo alto (≥6)

Dirección Postal: Hospital Clínico Universitario "Trinidad Chaves", s/n. 15705 Santiago. Tel. 981 950 000-Fax: 981 950 454-CJF: 0150205E - Hospital GI Chaves: Trinidad Chaves, s/n. Tel. 981 950 000-Fax: 981 950 454
 Hospital de Correo-SR Ramón Barja, s/n. Tel. 981 951 1000-Fax: 981 931 235-0708 Santiago - Hospital Psiquiátrico "Martín Herrero, 21 Tel. 981 951 9000-Fax: 981 951 9011-0708 Santiago





**Complexo Hospitalario
Universitario de
Santiago de Compostela**

Protocolo ESIGEM ANEXOS Recogida Datos

Escalas de valoración pronóstica

A/ Escala pronóstica Glasgow

- 1 Muerte
- 2 Estado vegetativo (incapaz de interactuar con el entorno)
- 3 Discapacidad severa (entiende y obedece ordenes, pero es dependiente)
- 4 Discapacidad moderada (el paciente es capaz de defenderse por si mismo, pero no de reincorporarse a su vida normal previa (colegio, trabajo...))
- 5 Discapacidad leve o no discapacidad (puede reintegrarse en su vida normal, ir al colegio...)

B/ Escala de rendimiento global (POPC)

1. Actividad NORMAL para su edad.
2. Problemas físicos MENORES (producen limitación pero permiten actividad dentro de la normalidad).
3. Condiciones físicas o médicas que LIMITAN las actividades de la vida diaria.
4. DEPENDIENTE de los demás.
5. COMA. Estado vegetativo

Dirección Psiquiátrica: Hospital Clínico Universitario "Francisco Chaves" s/n, 15706 Santiago, Tlf: 981 699 000 Fax: 981 699 444 C.R.F.: 0145020266 - Hospital O3 Cruces, Avenida Chaves, s/n Tlf: 981 699 000-15706 Santiago - Hospital de Compostela: Hospital de Compostela, s/n Tlf: 981 1000 Fax: 981 1031 255-15706 Santiago - Hospital Psiquiátrico: Hospital Psiquiátrico, s/n Tlf: 981 1000 Fax: 981 1031 255-15706 Santiago

B. Consentimiento informado.

Consentimiento Informado

Protocolo ESIGEM [2ª fase] – www.esigem.org

Estudio Sobre la Influencia Genética en la Enfermedad Meningocócica (E.S.I.G.E.M.)

Formulario de Consentimiento Informado (Original)

A. INFORMACION

Las infecciones por meningococos son enfermedades muy graves, con alto riesgo de mortalidad o secuelas. Los estudios genéticos y funcionales pueden ayudar a conocer mejor la enfermedad y podrían ayudar a prevenirlas y tratarlas.

Los estudios genéticos y funcionales pueden ser muy diversos. En este caso nos referimos al análisis en el ADN, el ARN, las citoquinas y los mediadores proteicos extraídos de una muestra de sangre y otra de saliva, de una serie de genes y parámetros que podrían estar relacionados con la respuesta a la infección por meningococo. Estos análisis no pueden realizarse de otra manera y no suponen riesgos adicionales para el paciente. Se obtendrá la muestra aprovechando una extracción obligada.

El estudio incluye también un cuestionario sobre antecedentes personales y familiares. La finalidad de la investigación es mejorar los conocimientos sobre la patología que afecta a mi hijo/a y no supone ningún beneficio directo para él/ella. La participación es voluntaria y la no aceptación de participar en este estudio no repercutirá en los cuidados médicos de mi hijo/a.

Se guardará confidencialidad acerca de su identidad y no será informado de los resultados de los estudios genéticos que se realicen, salvo petición expresa y cuando estos estuviesen disponibles al final del estudio. Dichos resultados serán remitidos a una publicación científica para su difusión, guardando estricta confidencialidad sobre su identidad. Sus muestras se almacenarán codificadas en nuestro centro indefinidamente bajo la responsabilidad del investigador principal y se podrán utilizar como control en otros estudios genéticos y/o funcionales realizados por nuestro equipo. En cualquier caso se respetarán sus derechos tal y como establece la ley de protección de datos española, garantizando lo recogido en la Ley 15/1999 de protección de datos.

B. CONSENTIMIENTO

Yo,.....(nombre y apellidos),
 con DNI, en calidad de (parentesco) del niño/a
, he leído y comprendido
 la información relativa a la realización del estudio genético en pacientes con
 enfermedad por meningococo (protocolo ESIGEM) y he podido preguntar las dudas
 que he considerado importantes.

Por eso, doy mi consentimiento para participar en dicho estudio.

Deseo, sin embargo,.....(opcional)

He sido informado adecuadamente de los puntos anteriores así como de los temas
 que de ellos se derivan por el facultativo D/Dª.....

En, a..... de de 200.....

Firma del padre/tutor Teléfono contacto familia:.....	Firma del facultativo Teléfono contacto:.....
--	--

Estudio Sobre la Influencia Genética en la Enfermedad Meningocócica (E.S.I.G.E.M.)

Formulario de Consentimiento Informado (Copia padre/tutor)

A. INFORMACION

Las infecciones por meningococos son enfermedades muy graves, con alto riesgo de mortalidad o secuelas. Los estudios genéticos y funcionales pueden ayudar a conocer mejor la enfermedad y podrían ayudar a prevenirlas y tratarlas.

Los estudios genéticos y funcionales pueden ser muy diversos. En este caso nos referimos al análisis en el ADN, el ARN, las citoquinas y los mediadores proteicos extraídos de una muestra de sangre y otra de saliva, de una serie de genes y parámetros que podrían estar relacionados con la respuesta a la infección por meningococo. Estos análisis no pueden realizarse de otra manera y no suponen riesgos adicionales para el paciente. Se obtendrá la muestra aprovechando una extracción obligada.

El estudio incluye también un cuestionario sobre antecedentes personales y familiares. La finalidad de la investigación es mejorar los conocimientos sobre la patología que afecta a mi hijo/a y no supone ningún beneficio directo para él/ella. La participación es voluntaria y la no aceptación de participar en este estudio no repercutirá en los cuidados médicos de mi hijo/a.

Se guardará confidencialidad acerca de su identidad y no será informado de los resultados de los estudios genéticos que se realicen, salvo petición expresa y cuando estos estuviesen disponibles al final del estudio. Dichos resultados serán remitidos a una publicación científica para su difusión, guardando estricta confidencialidad sobre su identidad. Sus muestras se almacenarán codificadas en nuestro centro indefinidamente bajo la responsabilidad del investigador principal y se podrán utilizar como control en otros estudios genéticos y/o funcionales realizados por nuestro equipo. En cualquier caso se respetarán sus derechos tal y como establece la ley de protección de datos española, garantizando lo recogido en la Ley 15/1999 de protección de datos.

B. CONSENTIMIENTO

Yo,.....(nombre y apellidos),
con DNI, en calidad de (parentesco) del niño/a
....., he leído y comprendido
la información relativa a la realización del estudio genético en pacientes con
enfermedad por meningococo (protocolo ESIGEM) y he podido preguntar las dudas
que he considerado importantes.

Por eso, doy mi consentimiento para participar en dicho estudio.

Deseo, sin embargo,..... (opcional)

He sido informado adecuadamente de los puntos anteriores así como de los temas
que de ellos se derivan por el facultativo D/Dª.....

En, a..... de de 200.....

Firma del padre/tutor	Firma del facultativo
Teléfono contacto familia:.....	Teléfono contacto:.....

Datos de Filiación Genética

Protocolo ESIGEM (2ª fase)

**Estudio Sobre la Influencia Genética en la Enfermedad Meningocócica
(E.S.I.G.E.M. – www.esigem.org)**

Datos de Filiación Genética

¡Atención!: Esta hoja cumplimentada debe ser enviada junto con la hoja de Consentimiento Informado y la muestra de sangre.

Por favor, complete con la mayor rigurosidad posible los siguientes apartados:

Código del Hospital:..... **Fecha recogida muestra(dd/mm/aa):**.....

Fecha ingreso en hospital (dd/mm/aa):..... **Nº de historia:**.....

Fecha Nacimiento (dd/mm/aaaa):..... **Sexo (M/F):**..... **Raza:**.....

Diagnóstico: *(cumplimentar ambos apartados según las definiciones y los datos disponibles actuales)*

-Sepsis Meningocócica (1), Meningitis meningocócica (2), Ambos (3):.....

- Sospecha Clínica (a), Caso Probable (b), Caso Confirmado(c):

Localidad (Provincia) de nacimiento niño:.....

Localidad (Provincia) de nacimiento padre:.....

Localidad (Provincia) de nacimiento madre:.....

Localidad (Provincia) de nacimiento abuelo paterno:.....

Localidad (Provincia) de nacimiento abuela paterna:.....

Localidad (Provincia) de nacimiento abuelo materno:.....

Localidad (Provincia) de nacimiento abuela materna:.....

Observaciones:_____

Fdo. Investigador Colaborador

C. Hoja de información para las familias.

Hoja de Información

Protocolo ESIGEM (2ª fase)

Estudio Sobre la Influencia Genética en la Enfermedad Meningocócica

(E.S.I.G.E.M. - WWW.ESIGEM.ORG)

Hoja de Información

En el momento actual, y a pesar de los avances en la prevención y el y tratamiento de las enfermedades provocadas por las bacterias llamadas meningococos, casi la mitad de los enfermos pueden fallecer, y más de la mitad de los que sobreviven, lo hacen con secuelas. Por eso, es esencial conocer mejor esta enfermedad para así tratar de prevenirla y curarla.

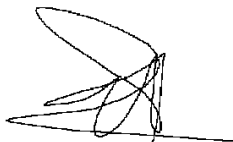
Las maneras de presentarse de esta infección son variadas, desde la simple presencia de la bacteria en la sangre con pocos signos de enfermedad, hasta el desencadenamiento de un fallo rápido de la función de varios órganos (corazón, pulmón, etc), que no responde siquiera a los tratamientos intensivos. Las razones que explican el por qué un paciente infectado por la *Neisseria* (bacteria causante de la enfermedad) desarrolle una u otra forma clínica de la enfermedad meningocócica, son múltiples y se conocen de forma incompleta. Una de las principales razones podría ser que, según las características genéticas de cada individuo, la reacción a la infección podría ser diferente.

Nuestro equipo de investigación, formado por pediatras y expertos en genética molecular, está realizando un estudio que puede suponer una oportunidad única de avanzar en el conocimiento de la **enfermedad meningocócica**. En dicho estudio participan los principales hospitales de nuestro país, con la colaboración del Laboratorio de Genética del Instituto de Medicina Legal, la Fundación Galega de Medicina Xenómica y del Centro Nacional de Genotipado (CEGEN; Santiago de Compostela).

El objetivo que perseguimos es conocer en qué medida la dotación genética del niño determina la expresividad clínica de la enfermedad (si afecta poco o mucho al paciente, y que órganos y en qué medida se ven afectados) y el pronóstico (si sobrevive o no, y si lo hace con o sin secuelas). Para ello, necesitamos por una parte una muestra de saliva y una muestra de sangre periférica de su hijo (cantidad máxima 6 ml) como la que se obtiene para los análisis de sangre ordinarios (de la que nosotros extraeremos el ADN, el ARN, citoquinas, y otros parámetros analíticos). Para ello, aprovecharíamos una extracción sanguínea ya prevista, o lo haríamos a través de un catéter ya implantado sin necesidad de pinchar al niño. Por otra parte, necesitamos que nos ayude a cumplimentar un cuestionario sencillo en el que se incluyen preguntas sobre sus antecedentes familiares y personales. Todos los datos serán manejados confidencialmente respetándose en todo momento su privacidad y la de su hijo. Aunque usted no será informado de los resultados del análisis, y dichos datos no modificarán el tratamiento que reciba su hijo, su participación supondrá una contribución esencial para avanzar en el conocimiento de esta terrible enfermedad, y esperamos que los resultados sí beneficien a otros niños en un futuro cercano.

Gracias de antemano por su consideración y su atención.

No dude en solicitar cualquier información adicional o plantearnos cualquier cuestión que estime oportuna.



Dr. Federico Martín Torres

Coordinador de la Red ESIGEM (www.esigem.org)

D. Aprobaciones éticas.

a. Comité de ética de la Universidad de Santiago de Compostela



VICERREITORÍA DE INVESTIGACIÓN
E INNOVACIÓN
Oficina de Investigación e Tecnoloxía

Edificio CACTUS – Campus universitario sur
15782 Santiago de Compostela
Tel. 981 547 040 - Fax 981 547 077
Correo electrónico: ctinfo@usc.es
<http://maisc.usc.es>

MANUEL CIFUENTES MARTÍNEZ, VICERRECTOR ADJUNTO DE INVESTIGACIÓN, 3º CICLO Y EXTENSIÓN DOCENTE Y PRESIDENTE DEL COMITÉ DE BIOÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA,



CERTIFICO: Que el proyecto de investigación titulado “E.S.I.G.E.M. Estudio sobre la influencia genética en la enfermedad meningocócica” del que son investigadores principales los profesores de la Universidad de Santiago de Compostela, **D. Antonio Salas Ellacuriaga** y **D. Federico Martín Torres** del Departamento de Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela, ha sido examinado y aprobado por el Comité de Bioética de esta Universidad, reunido el trece de diciembre del presente año, cumpliendo en su protocolo experimental los requisitos exigidos.

Y, para así conste a los efectos oportunos expido el presente certificado en Santiago de Compostela a trece de diciembre de dos mil cinco



A handwritten signature in blue ink, which appears to be 'M. Cifuentes', is written over the seal.

b. Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia

 <p>XUNTA DE GALICIA CONSELLERÍA DE SANIDADE</p>	<p>Edificio Administrativo San Lázaro 15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA Teléfono: 981 54 28 13 - Fax: 981 54 18 04 www.sergas.es</p>	 <p>SERGAS Comité Ético de Investigación Clínica Xeral Telf. (981) 54 64 25 - Fax (981) 54 18 04 E-mail: cec@sergas.es</p>
--	---	---

Informe del Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia

Dña. Margarita Tasende Souto, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia

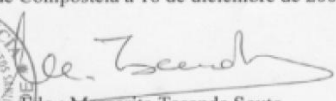
CERTIFICA:

Que este Comité ha evaluado, en su reunión del 16 de diciembre de 2005, la propuesta de la Fundación Pública Gallega de Medicina Genómica para que se realice el estudio titulado "E.S.I.G.E.M. (Estudio Sobre la Influencia Genética en la Enfermedad Meningocócica)", con nuestro número de registro: **2005/295**, y considera que:


Se cumplen los requisitos éticos aplicables a este tipo de estudios, están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto y es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.

Y que este Comité acepta, de conformidad con sus Procedimientos Normalizados de Trabajo, que dicho estudio sea realizado en el/los Centro/s: C.H. Universitario de Santiago; Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, por: Sonia Marcos Grande, Federico Martínón-Torres; Ángel Carracedo Álvarez, Antonio Salas Ellacuriaga, Ana Paula Vega Gliemmo como investigador/es principal/es.

Santiago de Compostela a 16 de diciembre de 2005.



Edo.: Margarita Tasende Souto



c. Aprobación de la sociedad española de cuidados intensivos pediátricos.



*Sociedad Española de Cuidados Intensivos
Pediátricos*

El estudio multicéntrico titulado “Estudio Sobre la Influencia Genética en la Enfermedad Meningocócica (E.S.I.G.E.M.)”, coordinado por Federico Martínón Torres del Servicio de Críticos, Intermedios y Urgencias Pediátricas Hospital Clínico Universitario de Santiago está avalado por la Sociedad Española de Cuidados Intensivos Pediátricos.

2 de noviembre de 2005

Corsino Rey Galán
Vocal de Estudios Multicéntricos y
Grupos de Trabajo de la SECIP

ANEXO II: Relación de publicaciones y actividades científicas más relevantes derivadas de la realización de la tesis doctoral y de sus resultados

“Si siembras la semilla con fe y se cuida con perseverancia, solo será cuestión de recoger sus frutos”.

(Tomás Carlyle)

**A. Web del estudio genético de la enfermedad meningocócica
(www.esigem.org)**

ESIGEM english version | versión en castellano

INICIO PROYECTO CENTROS FINANCIACIÓN ESIGEM PRODUCCIÓN CONTACTO

Estudio **S**obre la **I**nfluencia
Genética en la
Enfermedad **M**eningocócica

➔ [acceso investigador](#)

© 2009 PROTOCOLO ESIGEM, todos los derechos reservados. favoritos

Complexo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, NOVARTIS VACCINES, USC, Pfizer, IR&GALIP

ESIGEM

english version | **versión en castellano**

INICIO

PROYECTO

CENTROS

FINANCIACIÓN

ESIGEM

PRODUCCIÓN

CONTACTO

Aprobación ética:	Comité Etico de Investigación Clínica de Galicia (resolución nº2005/295)
Acreditación:	Sociedad Española de Cuidados Intensivos Pediátricos de la Asociación Española de Pediatría (2/11/2005)
Tipo de Estudio:	Ambispectivo multicéntrico
Objetivos:	Evaluar la influencia genética en la Enfermedad Meningocócica: - Correlacionar patrones genéticos y pronósticos - Correlacionar patrones genéticos y clínicos
Autores protocolo	Dr. Federico Martinón-Torres Dra. Sonia Marcos Alonso
Investigadores principales	Dr. Angel Carracedo Alvarez Dra. Sonia Marcos Alonso Dr. Federico Martinón-Torres Dr. Jose María Martinón Sánchez Dr. Antonio Salas Ellacuriaga Dra. Ana Paula Vega Gliemmo
Coordinador de ESIGEM	Federico Martinon-Torres

© 2009 PROTOCOLO ESIGEM, todos los derechos reservados.

favoritos

ESIGEM

english version | **versión en castellano**

INICIO

PROYECTO

CENTROS

FINANCIACIÓN

ESIGEM

PRODUCCIÓN

CONTACTO

El estudio será coordinado desde el centro investigador principal (**Hospital Clínico Universitario de Santiago**) por el equipo Investigador Principal.

El reclutamiento de pacientes se realizará a través de los siguientes centros:

- Hospital Clínico Universitario (Santiago)
- Hospital Universitario de Salamanca
- Hospital da Costa de Burela (Lugo)
- Complejo Hospitalario Cristal-Piñor (Ourense)
- Hospital Parc Paulí de Sabadell
- Hospital Donostia de San Sebastián
- Hospital Ramón y Cajal de Madrid
- Hospital Virgen de la Salud de Toledo
- Hospital Virgen de las Nieves de Granada
- Hospital Joan XXIII de Tarragona
- Hospital Universitario Central de Asturias
- Hospital General Universitario de Alicante
- Hospital Torrecárdenas de Almería
- Complejo Hospitalario Universitario de Vigo
- Complejo Hospitalario de Jaén
- Hospital San Juan de Dios (Barcelona)
- Hospital Infantil "La Fe" de Valencia
- Hospital Marqués de Valdecilla de Santander
- Hospital "Niño Jesús" de Madrid
- Hospital Juan Canalejo de La Coruña
- Hospital Gregorio-Marañón de Madrid
- Hospital Vall d'Hebron (Barcelona)
- Hospital Carlos Haya (Málaga)
- Hospital de Cruces (Vizcaya)
- Hospital Xeral-Calde (Lugo)
- Hospital Reina Sofía (Córdoba)
- Hospital "Virgen del Rocío" (Sevilla)
- Hospital Universitario de Albacete
- Hospital Clínico Universitario de Valencia
- Hospital Puerta del Mar (Cádiz)
- Hospital Virgen del Camino (Navarra)
- Hospital Infantil "La Paz" (Madrid)
- Hospital San Juan de Dios (Barcelona)
- Hospital Virgen de La Arrixaxa (Murcia)
- Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid)
- Hospital Rey Don Jaime (Castellón)
- Hospital San Cecilio (Granada)
- Hospital de Monforte (Lugo)
- Hospital Josep Trueta (Girona)
- Hospital Virxen da Xunqueira (Cee)
- Hospital 9 de Octubre (Valencia)
- Hospital de Sant Pau (Barcelona)
- Hospital Son Dureta (Palma de Mallorca)
- Hospital Arquitecto Marcide (Ferrol)

© 2009 PROTOCOLO ESIGEM, todos los derechos reservados.

favoritos



B. Artículos publicados

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

Investigating the Role of Mitochondrial Haplogroups in Genetic Predisposition to Meningococcal Disease

Antonio Salas^{1*}, Laura Fachal^{1,2}, Sonia Marcos-Alonso³, Ana Vega², Federico Martín-Torres^{4,5}, Grupo de investigación ESIGEM (Estudio Sobre la Influencia Genética en la Enfermedad Meningocócica)¹

1 Unidad de Xenética, Departamento de Anatomía Patolóxica e Ciencias Forenses and Instituto de Medicina Legal, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Galicia, Spain, 2 Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Hospital Clínico Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, Galicia, Spain, 3 Servicio de Pediatría, Hospital Universitario de A Coruña, A Coruña, Galicia, Spain, 4 Servicio de Críticos, Intermedios y Urgencias Pediátricas, Hospital Clínico Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, Galicia, Spain, 5 Grupo Gallego de Genética, Vacunas e Investigación Pediátrica, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago, Santiago de Compostela, Galicia, Spain

Abstract

Background and Aims: Meningococcal disease remains one of the most important infectious causes of death in industrialized countries. The highly diverse clinical presentation and prognosis of *Neisseria meningitidis* infections are the result of complex host genetics and environmental interactions. We investigated whether mitochondrial genetic background contributes to meningococcal disease (MD) susceptibility.

Methodology/Principal Findings: Prospective controlled study was performed through a national research network on MD that includes 41 Spanish hospitals. Cases were 307 paediatric patients with confirmed MD, representing the largest series of MD patients analysed to date. Two independent sets of ethnicity-matched control samples (CG1 [N=917]), and CG2 [N=616]) were used for comparison. Cases and controls underwent mtDNA haplotyping of a selected set of 25 mtDNA SNPs (mtSNPs), some of them defining major European branches of the mtDNA phylogeny. In addition, 34 ancestry informative markers (AIMs) were genotyped in cases and CG2 in order to monitor potential hidden population stratification. Samples of known African, Native American and European ancestry (N=711) were used as classification sets for the determination of ancestral membership of our MD patients. A total of 39 individuals were eliminated from the main statistical analyses (including fourteen gypsies) on the basis of either non-Spanish self-reported ancestry or the results of AIMs indicating a European membership lower than 95%. Association analysis of the remaining 268 cases against CG1 suggested an overrepresentation of the synonym mtSNP G11719A variant (Pearson's chi-square test; adjusted P-value=0.0188; OR [95% CI]=1.63 [1.22–2.18]). When cases were compared with CG2, the positive association could not be replicated. No positive association has been observed between haplogroup (hg) status of cases and CG1/CG2 and hg status of cases and several clinical variants.

Conclusions: We did not find evidence of association between mtSNPs and mtDNA hgs with MD after carefully monitoring the confounding effect of population sub-structure. MtDNA variability is particularly stratified in human populations owing to its low effective population size in comparison with autosomal markers and therefore, special care should be taken in the interpretation of seeming signals of positive associations in mtDNA case-control association studies.

Citation: Salas A, Fachal L, Marcos-Alonso S, Vega A, Martín-Torres F, et al. (2009) Investigating the Role of Mitochondrial Haplogroups in Genetic Predisposition to Meningococcal Disease. PLoS ONE 4(12): e8347. doi:10.1371/journal.pone.0008347

Editor: Lluís Quintana-Murci, Institut Pasteur, France

Received: August 1, 2009; **Accepted:** November 16, 2009; **Published:** December 17, 2009

Copyright: © 2009 Salas et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The present project and the ESIGEM research group were supported by grants from Xunta de Galicia (PGDIT06PXIB208079PR and Grupos Emerxentes: 2008/037), Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña (2008/CL444) and Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-02971) given to AS; Instituto Carlos III (Intensificación de la actividad investigadora) given to AVG; Consellería de Sanidade (Xunta de Galicia, RH1072-intensificación actividad investigadora), Instituto Carlos III (Intensificación de la actividad investigadora), and Convenio de colaboración de investigación (Wyeth España-Fundación IDICHUS), Fondo de Investigación Sanitaria (FIS; PI070069) del plan nacional de I+D+i and 'fondos FEDER' given to FMT. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: antonio.salas@usc.es

† Membership of the ESIGEM is provided in the Acknowledgments.

Introduction

The clinical presentation of meningococcal infections caused by *Neisseria meningitidis* is highly diverse. Invasive infections usually result in meningococcaemia, meningitis, or both [1,2]. Meningococcal disease (MD) remains one of the most important infectious causes of death in industrialized countries [1,2]. Mortality rates of patients with severe meningococcal sepsis may reach up to

40–50%, and those that survive may have severe complications that often require amputation and/or skin grafting [2]. The bacterium, *Neisseria meningitidis*, is only found in human hosts, and asymptomatic carriage can exceed 70% during outbreak situations [3]. The pathophysiology consists of a complex interaction of bacterial and host factors, triggered mainly by the release of endotoxin [3]. Individual response to meningococcal lipopolysaccharides involves also non-immunological mechanisms and the

activation of three main cascade reactions, the complement system, the coagulation and fibrinolysis pathways, and the inflammatory reaction mediated by different cytokines and chemokines [4]. Besides, many studies already support the idea that genetics plays an important role in MD (see [5] for a recent review). In this sense, we might hypothesize that mitochondrial genetic background could be one of these host genetic factors determining the response to *Neisseria meningitidis* infection and the individual course of meningococcal disease.

Mitochondrions contain multiple copies of mtDNA genomes. Each double-stranded circular mtDNA molecule consists of approximately 16569 base pairs (bps) encoding 37 genes: thirteen polypeptides (subunits of Complex I, III, and IV plus the ATP synthase complex), two ribosomal RNAs (rRNAs), and 22 transfer RNAs (tRNAs). The mtDNA is inherited through the matriline as a haplotypic block. In the jargon of population geneticists, clusters of closely-related mtDNA haplotypes are known as haplogroups (hgs). During the last two decades, population geneticists have comprehensively investigated the evolutionary patterns of worldwide mtDNA hgs, so that nowadays there is good knowledge of the global mtDNA phylogeny and the polymorphisms defining main and minor branches of the tree (basal motifs) (see e.g. [6,7,8,9,10,11,12,13,14,15]), as well as positional-mutation rates [16]. On the other hand, several sporadic or inherited mtDNA mutations are responsible for a number of mtDNA diseases (Leber's hereditary optic neuropathy [LHON], Leigh syndrome, etc) [17,18]. In addition, genetic variation of mtDNA has also been linked to several multi-factorial diseases (e.g. [19,20]) although some of their conclusions have been questioned (e.g. [7,11,21]).

The mtDNA variation has already been investigated in several infectious diseases. For instance, in an adult AIDS clinical trials group study, Hulgán et al. [22] claimed that the typically European hg T was involved in peripheral neuropathy during antiretroviral therapy. The results of Hendrickson et al. [23] suggest that mitochondrial genes are important indicators of AIDS disease progression in HIV-1 infected persons. Houshmand et al. [24] did not detect statistical significant differences between tuberculosis patients ($N=54$) and a control group ($N=256$) in a case-control study. MtDNA predisposition to sepsis has also been investigated in several studies. Thus, Baudouin et al. [25], by analysing 150 individuals who were sequentially admitted to an intensive care unit in the UK and 542 age-matched controls, determined that mtDNA hg H was a strong independent predictor of outcome during severe sepsis, conferring a 2.12-fold (95% CI 1.02–4.43) increased chance of survival at 180 days compared with individuals without hg H. More recently, Yang et al. [26] claimed that hg R can predict survival advantage in severe sepsis, a conclusion derived from the prospective analysis of 181 Han patients recruited in an intensive care unit.

There are major causes of type I errors in population-based association studies, such as hidden population sub-structure or inadequate correction for multiple testing [27,28,29,30,31,32,33]. The confounding effect of population sub-structure is particularly problematic in mtDNA studies because variation is strongly stratified in populations owing to its smaller effective population size in comparison with autosomal markers. For instance, it is well known from population genetic studies that several mtDNA variants are strongly stratified in the Iberian Peninsula, such as hg V, H1a, H3 and H5 that are highly prevalent in the Franco-Cantabrian refugee [6,34,35,36]; therefore, the Spanish population cannot be considered a single homogeneous population. Multi-centric studies involving dozens of laboratories and different medical specialists can help to add extra 'noise' to the sampling collection; for instance, the use of subjective criteria to assign

ethnic classes to patients or assignment of ethnicity based on self-reported ancestry [37,38] might contribute to increase stratification in mtDNA studies.

The present study aims to evaluate the potential pathogenic role of well-known mtDNA variants in MD. In contrast with most typical mtDNA case-control association studies, the additional goal of the present project was to further investigate the effect of confounding factors (such as stratification) in determining the apparent association of particular variants with the disease.

Results

Ancestry Assessment of Patients

Analysis of ancestry in patients was assessed by use of a classification group of population samples of known African, American, and European ancestry. As indicated in Figure 1, most of the cases have European ancestry; the average European membership in cases was 95% (SD: 10%), virtually equal to the values obtained for a typical European dataset. PCA plot (Figure 1) indicates that meningococcal patients clearly cluster in a single group, as evidenced also by the African and American samples. The amount of variation accounted by the PC1, PC2, and PC3 was ~29%, ~17%, and 13% respectively; ~59% in total.

Evaluating the Potential Association of mtDNA Haplogroups and Clinic-Pathological Variants

A total of 39 individuals were eliminated from the main statistical analyses (including fourteen gypsies) on the basis of non-Spanish self-reported ancestry or based on the results of AIMs indicating European membership lower than 95%. Association analysis was performed for the remaining 268 cases against CG1 ($N=917$). The power to detect odds ratios as low as 1.6 for mtSNPs and considering an average population minimum allele frequency (MAF) of 20% (lower than the average MAF in CG1) was 92%. Pearson's chi-square or Fisher's exact tests were used to assess association. We adjusted for multiple tests by implementing a permutation procedure as done in [21] and using 20,000 permutations. Association analysis of cases with CG1 suggested an overrepresentation of the synonym mtSNP G11719A variant (Pearson's chi-square test; adjusted P -value = 0.0188; OR [95% CI] = 1.63 [1.22–2.18]) with respect to CG1 (Table 1). The logical way to confirm this positive association is to explore a second independent sample of patients. Because, however, the prevalence of the MD is low (in contrast with other common complex diseases), recruitment of a second independent sample was not possible. The present study is in fact, to our knowledge, the largest series of MD patients analysed to date in genetic studies. The alternative way to replicate the association of G11719A variant with the disease is to explore a second sample of controls. Therefore, cases were compared against a second series of ethnicity-matched controls (CG2; $N=616$); the power to detect ORs as low as 1.6 for mtSNPs (MAF = 20%) using CG2 was 88% (Table 1). The association of G11719A observed in comparison of cases and CG1 could not be replicated with CG2. Instead, the A4769G variant appears as statistically significant, although marginal (Pearson's chi-square test; adjusted P -value = 0.0469) given a nominal value of significance of $\alpha=0.05$.

Analysis of population mtDNA data obtained from healthy individuals representing several Spanish geographical regions supports the spurious nature of the seeming positive association found in cases versus CG1 for the polymorphism G11719A (Text S1). The seeming association could be most likely due to the confounding effect of population stratification; in particular, the frequency of G11719A in CG1 is unusually low (Text S1). Other

mtDNA hgs in MD

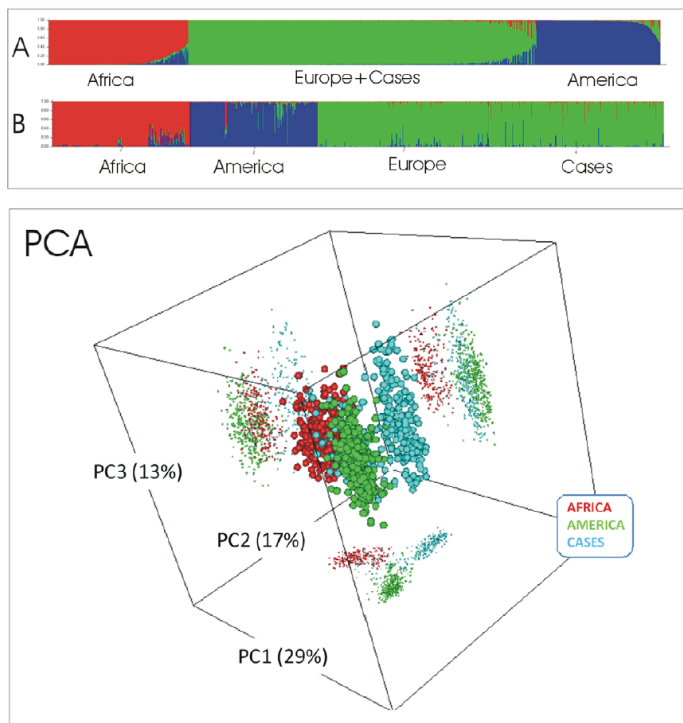


Figure 1. Analysis of population sub-structure in MD cases. On the left, analysis of population structure in CEPH panel samples (including 225 Africans, 208 Native Americans and 278 Europeans; see text for more details), and 307 meningococcal patients, based on a 34-plex autosomal AIMs for the assignment of ancestral origin with grouping values of $K=3$. Top panel (A) is the representation of membership of the samples as originally introduced in the analysis; the bottom panel (B) shows the same samples sorted by membership values. On the right, Principal Component Analysis of the same samples used in Text S1. PC1, PC2, and PC3 stand for principal components one, two and three, respectively; in rounded brackets is the amount of variation accounted by each component. doi:10.1371/journal.pone.0008347.g001

consideration about the harmful effect of population stratification in mtDNA case-control disease studies are commented in Text S1.

Analysis of association between hg status of patients and controls was also carried out (Table 2). The best P -value was obtained for hg R (0.005), which is however non statistically significant when correcting for multiple test using Bonferroni (adjusted significant value $\alpha = 0.00058$).

Among the several clinical variables analysed in the present study (Table 3), acute respiratory distress syndrome (ARDS) was found to be strongly associated with hg U (multinomial logistic regression; unadjusted P -value = 0.0025) being a strong predictor of increasing risk to ARDS (OR [95% CI] = 12.58 [2.41–64.93]); however, this association was lost when we adjusted the model using Bonferroni's correction and considered the full set of hypotheses tested in the study.

Discussion

Recent studies indicate that mitochondrial dysfunction plays a role in the pathogenesis of a number of human diseases. Variation in the mtDNA genome has been suggested as a risk factor in several

complex and common multi-factorial diseases. The present study aimed to analyse the potential role of several known mtSNPs as susceptibility factors in MD. We first filtered out from the statistical analysis the non-Spanish patients (excluding also those patients with non-Spanish mothers and/or grandmothers). Patients with a non-European self-reported ancestry or a non-European genetic background, assessed by a set of AIMs in cases and CG2, were also excluded from the study. These two initial criteria were rigorously applied in all patients in order to reduce as much as possible the potential confounding effect of hidden population stratification.

Statistical analysis of cases and CG1 indicated that polymorphism G11719A could be a strong indicator of susceptibility risk to MD. A second round of analyses using an independent series of controls (CG2) could not, however, confirm the initial finding, and instead suggested another mtSNP candidate with a marginal significant P -value, namely A4769G. We claim that the most plausible scenario that would explain this ambiguous result is the effect of residual hidden population stratification that could not be 'erased' by use of the tools described above because (i) the AIMs employed in the present study were not originally designed to detect differences within European

Table 1. Pearson's chi-square test for cases versus CG1 and CG2.

SNP	rCRS ref.	MAF cases	MA	MD cases versus CG1				MD cases versus CG2					
				MAF	Chi2 exact	P-value	adjusted P-value	OR (95% CI)	MAF	Chi2 exact	P-value	adjusted P-value	OR (95% CI)
G3010A	G	0.28	A	0.29	1.2372	0.266	0.9918	0.83 (0.61–1.15)	0.28	0.3997	0.527	1	0.90 (0.64–1.25)
T3197C	T	0.06	C	0.06	0.0356	0.85	1	0.95 (0.53–1.68)	0.10	4.0081	0.045	0.532	1.78 (1.01–3.14)
G3915A	G	0.02	A	0.02	0.8348	0.361	0.999	0.57 (0.17–1.94)	0.04	4.8407	0.028	0.374	0.28 (0.08–0.94)
C3992T	C	0.01	T	0.01	0.1432	0.705	1	0.78 (0.22–2.77)	0.01	0.0008	0.977	1	0.98 (0.25–3.82)
T4216C	T	0.17	C	0.18	0.0647	0.799	1	0.95 (0.66–1.37)	0.16	0.1798	0.672	1	0.92 (0.62–1.35)
T4336C	T	0.02	C	0.03	2.3434	0.127	0.8886	0.40 (0.12–1.35)	0.04	4.8627	0.027	0.3628	0.28 (0.08–0.94)
A4529T	A	0.02	T	0.02	0.1596	0.69	1	1.21 (0.47–3.10)	0.00	10.2116	0.004	0.0659	14.04 (1.68–117.18)
G4580A	G	0.04	A	0.04	2.8558	0.091	0.7941	0.60 (0.33–1.09)	0.03	4.5172	0.034	0.4381	0.49 (0.25–0.96)
A4769G	A	0.02	A	0.02	0.0002	0.989	1	0.99 (0.36–2.72)	0.00	11.2448	0.003	0.0469	–
A4793G	A	0.00	G	0.00	7.1652	0.007	0.1121	–	0.01	0.0735	0.786	1	0.80 (0.16–4.00)
T6776C	T	0.08	C	0.09	0.9034	0.342	0.9988	0.77 (0.46–1.32)	0.04	2.4415	0.118	0.8732	1.62 (0.90–3.01)
C7028T	C	0.47	T	0.49	6.1755	0.013	0.2	1.42 (1.08–1.87)	0.45	1.3431	0.246	0.9906	1.19 (0.89–1.59)
G8994A	G	0.02	A	0.02	2.3745	0.123	0.8827	1.90 (0.83–4.35)	0.02	2.6354	0.105	0.8395	2.10 (0.84–5.22)
G9055A	G	0.06	A	0.06	2.7059	0.1	0.8244	1.53 (0.92–2.55)	0.10	0.1954	0.658	1	0.89 (0.54–1.48)
A10398G	A	0.19	G	0.18	1.4671	0.226	0.9835	1.23 (0.88–1.73)	0.20	0.4369	0.509	1	1.13 (0.79–1.61)
C10400T	C	0.01	T	0.01	2.6015	0.107	0.8459	2.30 (0.81–6.53)	0.01	2.2218	0.136	0.9139	2.32 (0.74–7.27)
T10463C	T	0.10	C	0.10	0.0700	0.791	1	1.06 (0.68–1.67)	0.09	0.6038	0.437	0.9999	1.21 (0.74–1.97)
C10873T	C	0.03	C	0.02	4.9968	0.025	0.3374	0.46 (0.22–0.92)	0.04	0.6441	0.422	0.9999	0.75 (0.38–1.51)
G11719A	G	0.41	A	0.38	10.7820	0.001	0.0188	1.63 (1.22–2.18)	0.47	0.3430	0.558	1	1.09 (0.82–1.46)
A12308G	A	0.17	G	0.18	0.6261	0.429	0.9998	0.86 (0.59–1.25)	0.24	7.7546	0.006	0.0927	0.59 (0.40–0.86)
C12705T	C	0.09	T	0.08	6.5570	0.01	0.1549	1.75 (1.14–2.71)	0.07	7.1341	0.010	0.1533	1.89 (1.18–3.03)
G13708A	G	0.09	A	0.09	0.6741	0.412	0.9994	0.81 (0.48–1.35)	0.09	0.5517	0.458	1	0.82 (0.48–1.39)
A13966G	A	0.02	G	0.01	3.6348	0.057	0.6202	2.35 (0.95–5.81)	0.02	0.4319	0.511	1	1.34 (0.56–3.24)
C14766T	C	0.44	C	0.43	4.2540	0.039	0.4805	1.33 (1.01–1.75)	0.48	0.1177	0.752	1	1.05 (0.79–1.40)
T16519C	T	0.33	T	0.33	0.4574	0.499	1	1.11 (0.82–1.49)	0.35	1.3385	0.247	0.9911	1.20 (0.88–1.63)

rCRS: allele in the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) [55]; MA: allele with the lowest frequency; MAF: minimum allele frequency computed on control individuals; Adjusted P-value: adjustment of chi-square P-values was carried out with a permutation-based approach; number of permutations = 20,000; OR (95%CI): ORs were computed with the rCRS allele as a reference.
doi:10.1371/journal.pone.0008347.t001

populations and are probably even less efficient at detecting patterns of variation within Iberia; to our knowledge, such an ideal panel able to detect stratification on the geographic scale considered in the present study does not exist; and (ii) it is also possible that the detection of stratification using autosomal SNPs (e.g. Genomic Control) [32,53,54] is not at the level of resolution needed to detect population sub-structured patterns in mtDNA variability. Moreover, a proper implementation of a Genomic Control would require the use of various hundreds of autosomal SNPs (especially in markers strongly stratified as it is the case of mtDNA), which contrast with the few SNPs that are usually interrogated in case-control mtDNA studies. The use of AIMS, as done in the present study, could be a reasonable solution at least to detect obvious (genomic) outliers, but a more sensitive set of AIMS would be needed to detect stratification at the level of more homogeneous populations such as those from Spain mainland.

Our study concludes that mtDNA does not seem to play a role in MD susceptibility, course or prognosis; at least from the point of view of the mtSNPs analyzed in the present study and the population samples considered. However, the present study indicates that evidences of positive associations can arise from deficient sampling procedures or a lack of special care in

consideration of the potential confounding effects of population sub-structure in mtDNA studies. In our particular study, it was not possible to recruit a second independent collection of cases, owing to the relatively low prevalence of MD; note however that the present study is, to our knowledge, the largest MD cohort analysed to date for a genetic condition. This fact led us to consider a second group of matched controls to replicate the positive signal of association observed in the first control group; however, this time our best candidate mtSNP did not show evidences of association. Therefore, the use of two different control groups from the Iberian Peninsula has allowed us to rule out the presumable association of G11719A with MD. In addition, the use of a moderate approach to correct the undesirable effect of multiple tests in the inflation of type I error has also allowed us to avoid false claims of association of hg U with ARDS, a serious reaction to various forms of injuries to the lung and strongly related to MD patients. Our results also indicate that genotyping bias could also contribute undesirably to a false positive result in mtDNA association studies (see Text S1). Random variation of the test statistics could also explain at least in part the discrepancy observed between CG1 and CG2.

Table 2. Pearson's chi-square test for the hg status of cases versus CG1 and CG2.

HG	Freq. Cases	HG status in cases versus CG1			Freq. CG1	HG status in cases versus CG2			Freq. CG2
		Chi2 exact	P-value	OR (95% CI)		Chi2 exact	P-value	OR (95% CI)	
H	0.41	5.2881	0.021	1.38 (1.04–1.82)	0.41	0.9834	0.321	1.16 (0.87–1.55)	0.45
H1	0.20	0.0485	0.826	0.96 (0.68–1.35)	0.20	0.0453	0.831	1.04 (0.73–1.48)	0.21
H3	0.07	1.1113	0.292	1.33 (0.78–2.26)	0.09	1.2397	0.266	0.71 (0.39–1.30)	0.05
HV	0.47	2.4663	0.116	1.24 (0.95–1.63)	0.53	0.0086	0.926	1.01 (0.76–1.35)	0.48
I	0.02	0.0454	0.831	1.11 (0.41–3.01)	0.02	5.6451	0.018	0.17 (0.04–0.89)	0.00
J	0.06	1.1921	0.275	1.36 (0.78–2.39)	0.08	0.6421	0.423	1.27 (0.71–2.29)	0.07
J1	0.04	1.0250	0.311	1.39 (0.73–2.63)	0.06	1.0010	0.317	1.40 (0.72–2.73)	0.06
K	0.08	1.4794	0.224	0.73 (0.44–1.22)	0.06	0.0738	0.786	1.07 (0.64–1.80)	0.09
K1	0.07	1.5110	0.219	0.71 (0.41–1.23)	0.05	0.1968	0.657	1.13 (0.65–1.96)	0.08
R	0.87	8.0561	0.005	1.87 (1.21–2.90)	0.93	7.1341	0.008	1.89 (1.18–3.03)	0.93
R0	0.50	4.3115	0.038	1.33 (1.02–1.75)	0.58	0.0885	0.766	1.04 (0.78–1.39)	0.51
T	0.10	0.1017	0.750	0.93 (0.58–1.47)	0.09	0.4751	0.491	0.84 (0.51–1.38)	0.08
TJ	0.16	0.2749	0.600	1.10 (0.76–1.60)	0.17	0.0008	0.978	1.01 (0.68–1.49)	0.16
U	0.17	0.0244	0.876	1.03 (0.72–1.48)	0.18	4.9115	0.027	1.51 (1.05–2.18)	0.24
U5	0.04	0.6841	0.408	1.31 (0.69–2.49)	0.06	7.6008	0.006	2.39 (1.26–4.51)	0.10
V	0.06	2.8237	0.093	0.60 (0.33–1.09)	0.04	4.4651	0.035	0.50 (0.26–0.96)	0.03
W	0.01	0.2851	0.593	0.93 (0.23–2.34)	0.01	0.1928	0.661	0.76 (0.22–2.61)	0.01

The test was carried out for those (sub)hgs with frequencies above 5% in the control groups and also the well-known branches of the West European/Iberian phylogeny I, V, and W. Note that hg frequencies were inferred using the information from the whole haplotype available; this is why for instance, the frequency of hg R0 does not match with the frequency of G11719A.

doi:10.1371/journal.pone.0008347.t002

Spurious associations can easily arise from hidden minor levels of population stratification, even after those patients with a different genetic background have been filtered out. The risk of false positives owing to stratification is particularly high in mtDNA studies because the effective population size of this marker is lower than autosomal ones, and therefore mtDNA variability is more deeply structured in human populations. All together, these results suggest that more sensitive AIMs, suitable for detecting stratification within more restricted geographical locations (within the Spanish territory), would be needed in future studies. Special care must be taken in mtDNA association studies of multi-factorial diseases to avoid false claims of association.

Materials and Methods

Ethics Statement

The study was conducted according to the Spanish Law for Biomedical Research (Law 14/2007- 3 of July) and complied with the Declaration of Helsinki. The study and the use of archive samples for this project were approved by the Research Ethics Committee of Galicia and the Ethics Committee of the University of Santiago de Compostela. Written informed consent was obtained from all patients. All the samples were collected anonymously.

Study Subjects

A prospective controlled study performed through a national research network on MD (ESIGEM network – <http://www.esigem.org>) that includes 41 Spanish paediatric intensive care units was carried out between January 2006 and July 2008.

Cases were 307 paediatric patients with MD; the mean age at diagnosis was 3.7 years (SD: 3.9). More than 200 parameters of clinical interest were obtained from each patient, including

demographic, clinical, analytical, and prognostic data. Among these variables we included: (1) clinical data such as diagnosis and clinical presentation, vaccination status, time from starting symptoms to admission, length of stay at the paediatric critical care unit and at the hospital ward, mortality, morbidity, treatment, and also two scores (Paediatric Risk of Mortality Score, and Meningococcal Septic Shock Score); (2) microbiology data such as serogroup, serotype and place of isolation; and (3) laboratory data comprising white and red cells, platelets, glucose, creatine, sodium, potassium, pH, PaO₂/FiO₂, calcium, coagulation test and procalcitonine. However, in order to minimise the number of hypotheses tested, only a selection of the 25 most important ones was used for comparison with the hg status of patients (Table 3).

Two different ethnicity-matched control series were used. The first series (CG1) comprised 917 Spanish individuals, including breast cancer patients and controls that were previously employed in [21,39]; a sub-sample of the CG1 was previously tested for population stratification by means of a panel of neutral autosomal SNPs [40]. The second control series (CG2) included 616 new genotyped Spanish individuals. A third group composed of 597 sporadic breast cancer cases and controls (CG3), collected in the Canary Islands, was additionally used to test some additional hypotheses (see below). Genotypes in the cases and controls series were re-checked by two independent analysts in order to minimise the probability of genotyping errors. Ambiguous calls were eliminated from the analysis.

mtSNP Selection

All the samples were genotyped for a set of 25 mtSNPs, some of them representing main branches of the European mtDNA phylogeny, such as hg H, U, K, etc.; the panel fully overlapped with the mtSNPs genotyped in [21].

Table 3. Summary of demographic and clinical data of the children included in the study (n = 358/398).

Age (years)		3.7 (3.9)
Sex (M:F ratio)		1.63:1
Definitive diagnosis (%)[*]		75% of cases
Serogroup (%)[#]		
	B	57% [#]
	C	4%
	not available / not serogrouped	38%
Ethnicity (%)		
	Western Europeans	87%
	Other ethnicities or population groups	13%
Diagnosis		
	Meningococemia	50%
	Meningitis	12%
	Both	38%
Clinical presentation		
	Septicaemia	59%
	Severe sepsis	11%
	Septic shock	30%
Clinical Scores		
	Meningococcal Septic Shock Score (MSSS)	1.4 (2.25)
	Glasgow Coma Scale (GCS)	12.9 (2.9)
	PRISM score	9.5 (12.5)
Organ involvement / Clinical features (%)[*]		
	Purpuric rash	81%
	Distal vascular compromise	9%
	DIC	35%
	Cardiovascular dysfunction	45%
	Acute pulmonary lesion	11%
	Acute respiratory distress syndrome	8%
	Neurological dysfunction	24%
	Oligoanuria	18%
	Renal dysfunction	10%
	Hematological dysfunction	35%
	Refractory hypotension	16%
	Liver dysfunction	7.5%
	Purpuric rash	81%
Outcome		
	Glasgow Outcome Scale (GOS)	4.8 (0.7)
	Pediatric Overall Performance Category (POPC)	1.2 (0.7)
	Exitus (%)	16 exitus (4%)

^{*} Isolation of *Neisseria meningitidis* from a normally sterile site; OR detection of specific meningococcal DNA sequences in a specimen from a normally sterile site by nucleic acid amplification testing. The rest of subjects fulfilled suggestive criteria (detection of Gram-negative diplococci in Gram's stain of specimen from a normally sterile site or from suspicious skin lesion; or high titre immunoglobulin class M (IgM) or significant rise in IgM or immunoglobulin class G (IgG) titres to outer membrane protein antigens of *N. meningitidis*).

[#] B serogroup accounted for 91.6% of all serogrouped samples.

^{*} Detected anytime during the illness and defined according to Goldstein et al. *Pediatr Crit Care Med* 2005;6:2–8.

DIC disseminated intravascular coagulation.

Results are expressed as mean (sd) unless otherwise specified.

doi:10.1371/journal.pone.0008347.t003

Ancestry Test

A panel of 34 autosomal AIMs was used to assess ancestry in cases and CG2. These SNPs exhibit highly contrasting allele

frequency distributions between major population groups. Assignment of population membership of our Spanish patients into African, Native American, and European ancestry was assessed by

adding a sub-set of samples from the CEPH panel (Centre d'Etude du Polymorphisme Humain; <http://www.cephb.fr/>) as well as additional samples from the *SNPforID* project [41]; all of them were also genotyped for the same 34-plex panel. These samples represented the three main ancestral source populations that would probably have contributed to the present genetic composition of the Spanish population (considering the existence of recent immigrants coming mainly from America and Africa), and in particular to our sample of MD patients. Genotypes were retrieved with the *SNPforID* browser (<http://spsmart.cesga.es/snpforid.php>; [42]; see also [43]). The final sets of samples used for the inference of individual ancestry were as follows: Africa ($N=225$), including Biaka Pygmy (Central African Republic; $N=23$), Mbuti Pygmy (Democratic Republic of Congo; $N=13$), Bantu-speakers from Kenya ($N=11$), Mozambique ($N=60$), San (Namibia; $N=6$), Yoruba (Nigeria; $N=22$), Mandenka (Senegal; $N=22$), Somalia ($N=60$), South African Bantu ($N=8$); America ($N=208$), including Karitiana (Brazil; $N=14$), Surui (Brazil; $N=8$), Awa (Colombia; $N=38$), CEPH-Colombians ($N=7$), Coiyama (Colombia; $N=71$), Pijao (Colombia; $N=35$), Maya (Mexico, $N=21$), Pima (Mexico, $N=14$); and Europe ($N=278$), including Denmark ($N=60$), French-Basques (France, $N=24$), France ($N=28$), Sardinia (Italy, $N=28$), Tuscany (Italy, $N=8$), Bergamo (Italy; $N=13$), Galicians (North-West Spain; $N=60$), Orkney Islands (Scotland; $N=15$), Russia ($N=25$), Adygei (Russian Caucasus; $N=17$).

STRUCTURE v.2.3.1 [33] was used to estimate the proportion of inferred ancestry of individuals (membership) into Europe, America, and Africa groups. This information was employed to monitor the effect of population stratification in association tests. Runs consisted of 200,000 Markov Chain steps after a burn-in of length 200,000 with five replicates for each K value from two to six. The *a posteriori* probability of K equal to three was virtually one.

AIMs variability was also analysed by Principal Component Analysis (PCA). A modified version of the R library *SNPassoc* [44] that allows for tri-allelic SNP status was used.

Minisequencing Genotyping

All the samples were genotyped according to the protocols described in [45,46] for the mtSNPs and according to [41] for the AIMs. In both cases, the genotyping method was based on a minisequencing SNaPshot approach. MtDNA haplotypes were checked by a phylogenetic-based approach as performed in previous studies [47,48,49,50,51], in order to minimise the probability of genotyping errors.

Association Tests

Associations were assessed for individual mtSNPs by comparison of allele frequencies between cases and controls for the two control series separately (CG1 and CG2), and with a one degree of freedom chi-square test, or Fisher's exact test for cell counts below five. A permutation test was used to address the issue of multiple testing in mtSNP association tests. Unconditional logistic regression was used to model the effect of hg status in clinical variables, as well as to model the effect of these variables with respect to ancestry proportions of patients. Multinomial logistic regression was used to test association in the case of clinical variables of multinomial nature.

The statistical packages Stata v.8 (<http://www.stata.com/>) and R (<http://www.r-project.org/>) were employed to carry out most of the statistical analysis. Multinomial logistic regression was computed by means of the R library *vglm*.

Power calculations were performed in the Quanto software [52]. Power is computed under allelic principles that do not necessarily fulfil the specific conditions affecting mtDNA variants. There is

however no other option available that is specifically designed to compute power in mtDNA case-control disease studies.

Supporting Information

Text S1 Population sub-structure of mtDNA variants.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0008347.s001 (0.29 MB DOC)

Acknowledgments

We would like to thank M. García-Magariños for useful discussion concerning some statistical issues.

ESIGEM Research Group (Estudio sobre la Influencia Genética en la Enfermedad Meningocócica)—ESIGEM research network composition: Dr José María Martín Sánchez and Dra Fernanda Pardo Sánchez (Hospital Clínico Universitario; Santiago de Compostela, Spain); Dra Ana Mosquera-Miguel, Dr Manuel Fondevila, Dra Vanesa Álvarez-Iglesias (Unidade de Xenética, Facultade de Medicina, Universidade de Santiago de Compostela; Santiago de Compostela, Spain); Dr José Manuel Sánchez Granados (Hospital Universitario; Salamanca, Spain); Dr Manuel Silveira Cancela (Hospital da Costa de Burela; Burela, Spain); Dr José Luis García Rodríguez and Dra Susana Rey García (Complejo Hospitalario; Ourense, Spain); Dra Cristina Calvo Monge (Hospital de Donostia; Donostia, Spain); Dr Valentí Pineda Solas (H. Parc Paulí; Sabadell, Spain); Dr César Pérez Caballero Macarrón (Hospital Ramón y Cajal; Madrid, Spain); Dr J. Antonio Alonso Martín and Dr David Arjona Villanueva (Hospital Virgen de la Salud; Toledo, Spain); Dra Pilar Azcón González de Aguilera (Hospital Virgen de las Nieves; Granada, Spain); Dr Xavier Allué Martínez (Hospital Juan XXIII; Tarragona, Spain); Dr Andrés Concha Torre (Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain); Dr José Luis Ruibal Francisco (Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain); Dr Manuel González-Ripoll Garzón and Dr Francisco Giménez Sánchez (Hospital de Torrecárdenas; Almería, Spain); Dr Alfredo Reparaz Romero and Dr Manuel Ortiz Pallares (Complejo Hospitalario Universitario; Vigo, Spain); Dra M^a. Leticia Millán Millares and M^a Carmen Martínez Padilla (Complejo Hospitalario; Jaén, Spain); Dr Rafael Gómez Zafra (Hospital La Fe; Valencia, Spain); Dr Alvaro Castellanos Ortega (Hospital Marqués de Valdecillas; Santander, Spain); Dr Juan Casado Flores (Hospital Niño Jesús; Madrid, Spain); Dra Ángela Ferrer Barba and Dra Ana Hurtado Doce (Complejo Hospitalario Universitario; A Coruña, Spain); Dra Amaya Bustinza Arriortua and Dra María Luisa Navarro Gómez (Hospital Gregorio Marañón; Madrid, Spain); Dra Elizabeth Esteban Torné (Hospital Sant Joan de Deu; Barcelona, Spain); Dra Sonia Cañadas Palazón (Hospital Vall d'Hebrón; Barcelona, Spain); Dr Custodio Calvo Macías (Hospital Carlos Haya; Málaga, Spain); Dra Elvira Morteruel Arizkuren and Dr Julio López Bayón (Hospital de Cruces; Bilbao, Spain); Dra Soledad Martínez Regueira (Hospital Xeral Calde; Lugo, Spain); Dr Juan Luis Pérez Navero (Hospital Reina Sofía; Córdoba, Spain); Dra María Teresa Alonso Salas (Hospital Virgen del Rocío; Sevilla, Spain); Dra María del Mar Ballesteros García (Hospital Universitario; Albacete, Spain); Dr Juan Ignacio Muñoz Bonet (Hospital Clínico Universitario; Valencia, Spain); Dr Servando Pantoja Rosso (Hospital Puerta del Mar; Cádiz, Spain); Dr Enrique Bernaola Iturbe and Dra Concepción Goñi Oraven (Hospital Virgen del Camino; Navarra, Spain); Dr Francisco Alvarado Ortega (Hospital La Paz; Madrid, Spain); Dra Natalia Molini Menchón (Hospital Rey Don Jaime; Castellón, Spain); Dr Santiago Fernández Cebrián (Hospital de Monforte, Monforte, Spain); Dr Manuel Baca Cots (Hospital General de La Axarquía, Málaga, Spain); Dra Madalena Filipa Martins Prata (Hospital de Santa Maria; Lisboa, Spain); Dra Esther Ocete Hita (Hospital San Cecilio; Granada, Spain); Dr Mario Sánchez Fernández (Hospital Josep Trueta; Girona, Spain); Dra Isabel Quintela Fernández (Hospital Virxe da Xunqueira, Cee, A Coruña, Spain); and Dr Rafael López Peña (Hospital 9 de Octubre; Valencia, Spain). Further details may be consulted at <http://www.esigem.org>.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AS LF SMA AV FMT. Performed the experiments: LF. Analyzed the data: AS FMT. Contributed reagents/materials/analysis tools: AS SMA AV FMT. Wrote the paper: AS FMT.

References

- Hodgetts TJ, Brett A, Castle N (1998) The early management of meningococcal disease. *J Accid Emerg Med* 15: 72–76.
- Kirsch EA, Barton RP, Kitchen L, Giroir BP (1996) Pathophysiology, treatment and outcome of meningococemia: a review and recent experience. *Pediatr Infect Dis J* 15: 967–978; quiz.
- Lo H, Tang CM, Esley RM (2009) Mechanisms of avoidance of host immunity by *Neisseria meningitidis* and its effect on vaccine development. *Lancet Infect Dis* 9: 418–427.
- Emonts M, Hazelzet JA, de Groot R, Hermans PW (2003) Host genetic determinants of *Neisseria meningitidis* infections. *Lancet Infect Dis* 3: 565–577.
- Brouwer MC, de Gans J, Heckenberg SG, Zwinderman AH, van der Poll T, et al. (2009) Host genetic susceptibility to pneumococcal and meningococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 9: 31–44.
- Loogvää E-L, Rostalu U, Malyarchuk BA, Derenko MV, Kivisild T, et al. (2004) Disuniting uniformity: a pied clastic canvas of mtDNA haplogroup H in Eurasia. *Mol Biol Evol* 21: 2012–2021.
- Kong QP, Bandelt HJ, Sun C, Yao YG, Salas A, et al. (2006) Updating the East Asian mtDNA phylogeny: a prerequisite for the identification of pathogenic mutations. *Hum Mol Genet* 15: 2076–2086.
- Torroni A, Achilli A, Macaulay V, Richards M, Bandelt HJ (2006) Harvesting the fruit of the human mtDNA tree. *Trends Genet* 22: 339–345.
- Behar DM, Villemers R, Soodyall H, Blue-Smith J, Pereira L, et al. (2008) The dawn of human matrilineal diversity. *Am J Hum Genet* 82: 1130–1140.
- Perego UA, Achilli A, Angerhofer N, Accetturo M, Pala M, et al. (2009) Distinctive Paleo-Indian migration routes from Beringia marked by two rare mtDNA haplogroups. *Curr Biol* 19: 1–8.
- Achilli A, Perego UA, Bravi CM, Coble MD, Kong QP, et al. (2008) The phylogeny of the four pan-American mtDNA haplogroups: implications for evolutionary and disease studies. *PLoS ONE* 3: e1764.
- Palanichamy MG, Sun G, Agrawal S, Bandelt HJ, Kong Q-P, et al. (2004) Phylogeny of mitochondrial DNA macrohaplogroup N in India, based on complete sequencing: implications for the peopling of South Asia. *Am J Hum Genet* 75: 966–978.
- Richards M, Macaulay V, Hickey E, Vega E, Sykes B, et al. (2000) Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool. *Am J Hum Genet* 67: 1251–1276.
- Salas A, Richards M, De la Fè T, Lareu MV, Sobrino B, et al. (2002) The making of the African mtDNA landscape. *Am J Hum Genet* 71: 1082–1111.
- Quintana-Murci L, Quach H, Harmant C, Luca F, Massonnet B, et al. (2008) Maternal traces of deep common ancestry and asymmetric gene flow between Pygmy hunter-gatherers and Bantu-speaking farmers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 1596–1601.
- Soares P, Ermini L, Thomson N, Mormina M, Rito T, et al. (2009) Correcting for purifying selection: an improved human mitochondrial molecular clock. *Am J Hum Genet* 84: 740–759.
- Chinnery PF, Turnbull DM (1999) Mitochondrial DNA and disease. *Lancet* 354 Suppl 1: S117–21.
- Wallace DC (2005) A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 39: 359–407.
- Bai RK, Leal SM, Covarrubias D, Liu A, Wong LJ (2007) Mitochondrial genetic background modifies breast cancer risk. *Cancer Res* 67: 4687–4694.
- Gasparre G, Porcelli AM, Bonora E, Pennisi LF, Toller M, et al. (2007) Disruptive mitochondrial DNA mutations in complex I subunits are markers of oncogenic phenotype in thyroid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 9001–9006.
- Mosquera-Miguel A, Álvarez-Iglesias V, Vega A, Milne R, Cabrera de León A, et al. (2008) Is mitochondrial DNA variation associated with sporadic breast cancer risk? *Cancer Res* 68: 623–625.
- Hulgan T, Haas DW, Haines JL, Ritchie MD, Robbins GK, et al. (2005) Mitochondrial haplogroups and peripheral neuropathy during antiretroviral therapy: an adult AIDS clinical trials group study. *AIDS* 19: 1341–1349.
- Hendrickson SL, Hutcheson HB, Ruiz-Pesini E, Poole JC, Lautenberger J, et al. (2008) Mitochondrial DNA haplogroups influence AIDS progression. *AIDS* 22: 2429–2439.
- Houshmand M, Banoci MM, Tabarsi P, Panahi MS, Kashani BH, et al. (2007) Do mitochondrial DNA haplogroups play a role in susceptibility to tuberculosis? *Respirology* 12: 823–827.
- Baudouin SV, Saunders D, Tiangyou W, Elson JL, Poynter J, et al. (2005) Mitochondrial DNA and survival after sepsis: a prospective study. *Lancet* 366: 2118–2121.
- Yang Y, Shou Z, Zhang P, He Q, Xiao H, et al. (2008) Mitochondrial DNA haplogroup R predicts survival advantage in severe sepsis in the Han population. *Genet Med* 10: 187–192.
- Cardon LR, Palmer LJ (2003) Population stratification and spurious allelic association. *Lancet* 361: 598–604.
- Salas A, Carracedo Á (2007) Studies of association in complex diseases: statistical problems related to the analysis of genetic polymorphisms. *Rev Clin Esp* 207: 563–565.
- Ioannidis JP (2005) Why most published research findings are false. *PLoS Med* 2: e124.
- Ioannidis JP (2007) Why most published research findings are false: author's reply to Goodman and Greenland. *PLoS Med* 4: e215.
- Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG (2001) Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet* 29: 306–309.
- Devlin B, Roeder K (1999) Genomic control for association studies. *Biometrics* 55: 997–1004.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Álvarez-Iglesias V, Mosquera-Miguel A, Cerezo M, Quintans B, Zarrabeitia MT, et al. (2009) New population and phylogenetic features of the internal variation within mitochondrial DNA macro-haplogroup R0. *PLoS ONE* 4: e5112.
- Achilli A, Rengo C, Magri C, Battaglia V, Olivieri A, et al. (2004) The molecular dissection of mtDNA haplogroup H confirms that the Franco-Cantabrian glacial refuge was a major source for the European gene pool. *Am J Hum Genet* 75: 910–918.
- Torroni A, Bandelt HJ, Macaulay V, Richards M, Cruciani F, et al. (2001) A signal, from human mtDNA, of postglacial recolonization in Europe. *Am J Hum Genet* 69: 844–852.
- Salas A, Acosta A, Álvarez-Iglesias V, Cerezo M, Phillips C, et al. (2008) The mtDNA ancestry of admixed Colombian populations. *Am J Hum Biol* 20: 584–591.
- Salas A, Bandelt HJ, Macaulay V, Richards MB (2007) Phylogeographic investigations: the role of trees in forensic genetics. *Forensic Sci Int* 168: 1–13.
- Vega A, Salas A, Milne RL, Carracedo B, Ribas G, et al. (2009) Evaluating new candidate SNPs as low penetrance risk factors in sporadic breast cancer: a two-stage Spanish case-control study. *Gynecol Oncol* 112: 210–214.
- Milne RL, Ribas G, González-Neira A, Fagerholm R, Salas A, et al. (2006) *ERCC4* associated with breast cancer risk. A two-stage case-control study using high-throughput genotyping. *Cancer Res* 66: 9420–9427.
- Phillips C, Salas A, Sánchez JJ, Fondevila M, Gómez-Tato A, et al. (2007) Inferring ancestral origin using a single multiplex assay of ancestry-informative marker SNPs. *Forensic Sci Int Genet* 1: 273–280.
- Amigo J, Salas A, Phillips C, Carracedo A (2008) SPSmart: adapting population based SNP genotype databases for fast and comprehensive web access. *BMC Bioinformatics* 9: 428.
- Amigo J, Phillips C, Salas A, Carracedo A (2009) Viability of in-house datamarting approaches for population genetics analysis of SNP genotypes. *BMC Bioinformatics* 10: S5.
- González JR, Armengol L, Sole X, Guino E, Mercader JM, et al. (2007) SNPpass: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* 23: 644–645.
- Quintans B, Álvarez-Iglesias V, Salas A, Phillips C, Lareu MV, et al. (2004) Typing of mitochondrial DNA coding region SNPs of forensic and anthropological interest using SNaPshot minisequencing. *Forensic Sci Int* 140: 251–257.
- Álvarez-Iglesias V, Barros F, Carracedo A, Salas A (2008) Minisequencing mitochondrial DNA pathogenic mutations. *BMC Med Genet* 9: 26.
- Bandelt HJ, Quintana-Murci L, Salas A, Macaulay V (2002) The fingerprint of phanton mutations in mitochondrial DNA data. *Am J Hum Genet* 71: 1150–1160.
- Bandelt HJ, Salas A, Bravi C (2004) Problems in FBI mtDNA database. *Science* 305: 1402–1404.
- Bandelt HJ, Salas A, Lutz-Bonengel S (2004) Artificial recombination in forensic mtDNA population databases. *Int J Legal Med* 118: 267–273.
- Salas A, Carracedo A, Macaulay V, Richards M, Bandelt HJ (2005) A practical guide to mitochondrial DNA error prevention in clinical, forensic, and population genetics. *Biochem Biophys Res Commun* 335: 891–899.
- Salas A, Yao YG, Macaulay V, Vega A, Carracedo A, et al. (2005) A critical reassessment of the role of mitochondria in human evolution. *PLoS Med* 2: e296.
- Gauderman WJ (2002) Sample size requirements for matched case-control studies of gene-environment interaction. *Stat Med* 21: 35–50.
- Bacanu SA, Devlin B, Roeder K (2000) The power of genomic control. *Am J Hum Genet* 66: 1933–1944.
- Marchini J, Cardon LR, Phillips MS, Donnelly P (2004) The effects of human population structure on large genetic association studies. *Nat Genet* 36: 512–517.
- Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, et al. (1999) Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 23: 147.

REVISIÓN

PEDIÁTRICA

Acta Pediatr Esp. 2010; 68(2): 6-12

La genómica al servicio de la pediatría en el estudio de la enfermedad multifactorial

A. Salas^{1,2}, S. Marcos-Alonso^{3,6}, A. Vega^{2,4}, L. Fachal^{1,2}, F. Martín-Torres^{5,6}; Grupo de investigación ESIGEM*

¹Unidade de Xenética. Departamento de Anatomía Patolóxica e Ciencias Forenses. Instituto de Medicina Legal. Facultade de Medicina. Universidade de Santiago de Compostela. ²Grupo de Medicina Xenómica. Hospital Clínico Universitario. Santiago de Compostela. ³Servicio de Pediatría. Hospital Universitario de La Coruña. ⁴Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica. SERGAS. Hospital Clínico Universitario. Santiago de Compostela. ⁵Servicio de Críticos, Intermedios y Urgencias Pediátricas. Hospital Clínico Universitario. Santiago de Compostela. ⁶Grupo Gallego de Genética, Vacunas e Investigación Pediátricas. Instituto de Investigaciones Sanitarias de Santiago de Compostela. *El Grupo ESIGEM (Estudio Sobre la Influencia Genética en la Enfermedad Meningocócica), es un grupo multicéntrico peninsular de trabajo e investigación, integrado por los siguientes miembros: J.M. Martín Sánchez (Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela); J.M. Sánchez Granados (Hospital Universitario de Salamanca); M. Silveira Cancela (Hospital da Costa de Burela); J.L. García Rodríguez y S. Rey García (Complejo Hospitalario de Orense); C. Calvo Monge (Hospital de Donostia); V. Pineda Solas (Hospital «Parc Pauli» de Sabadell); C. Pérez Caballero Macarrón (Hospital «Ramón y Cajal» de Madrid); J.A. Alonso Martín y D. Arjona Villanueva (Hospital «Virgen de la Salud» de Toledo); P. Azcón González de Aguilar (Hospital «Virgen de las Nieves» de Granada); X. Allué Martínez (Hospital «Juan XXIII» de Tarragona); A. Concha Torre (Hospital Universitario Central de Asturias); J.L. Ruibal Francisco (Hospital Clínico «San Carlos» de Madrid); M. González-Ripoll Garzón y F. Giménez Sánchez (Hospital Torrecárdenas de Almería); A. Reparaz Romero y M. Ortiz Pallares (Complejo Hospitalario Universitario de Vigo); M.L. Millán Millares y M.C. Martínez Padilla (Complejo Hospitalario de Jaén); R. Gómez Zafra (Hospital «La Fe» de Valencia); Á. Castellanos Ortega (Hospital «Marqués de Valdecillas» de Santander); J. Casado Flores (Hospital «Niño Jesús» de Madrid); Á. Ferrer Barba y A. Hurtado Doce (Complejo Hospitalario Universitario de La Coruña); A. Bustinza Arriortua y M.L. Navarro Gómez (Hospital «Gregorio Marañón» de Madrid); E. Esteban Torné (Hospital «San Joan de Déu» de Barcelona); S. Cañadas Palazón (Hospital «Vall d'Hebron» de Barcelona); C. Calvo Macías (Hospital «Carlos Haya» de Málaga); E. Morteruel Arizkuren y J. López Bayón (Hospital de Cruces de Bilbao); S. Martínez Regueira (Hospital Xeral Calde de Lugo); J.L. Pérez Navero (Hospital «Reina Sofía» de Córdoba); M.T. Alonso Salas (Hospital «Virgen del Rocío» de Sevilla); M.M. Ballesteros García (Hospital Universitario de Albacete); J.I. Muñoz Bonet (Hospital Clínico Universitario de Valencia); S. Pantoja Rosso (Hospital «Puerta del Mar» de Cádiz); E. Bernaola Iturbe y J. Guibert Valencia (Hospital «Virgen del Camino» de Navarra); F. Alvarado Ortega (Hospital «La Paz» de Madrid); N. Molini Menchón (Hospital «Rey Don Jaime» de Castellón); S. Fernández Cebrián (Hospital de Monforte, Lugo); M. Baca Cots (Hospital General de La Axarquía, Málaga); M.F. Martins Prata (Hospital de «Santa Maria», Lisboa); E. Ocete Hita (Hospital «San Cecilio» de Granada); M. Sánchez Fernández (Hospital «Josep Trueta» de Girona); I. Quintela Fernández (Hospital «Virxe da Xunqueira», Cee, La Coruña); R. López Peña (Hospital «9 de Octubre» de Valencia); A. Mosquera-Miguel y M. Fondevila (Facultade de Medicina, Universidade de Santiago de Compostela).

Resumen

En estos últimos años hemos asistido al enorme desarrollo de la genómica y sus aplicaciones en diversos campos de la biomedicina. Esto ha sido en gran parte posible gracias al gran empuje tecnológico que han experimentado las nuevas técnicas de genotipificación y de ultrasecuenciación. Sin duda, el estudio de la enfermedad compleja ha sido uno de los grandes beneficiados de este gran desarrollo. Asimismo, existen muchas enfermedades pediátricas que pueden abordarse siguiendo las estrategias que, hoy por hoy, se emplean en la genómica de la enfermedad multifactorial. Esta revisión pretende acercarnos a la pediatría las posibilidades que ofrece la genómica de hoy en día en este campo. Para ello, se discuten los distintos modelos de estudios, así como los problemas que a menudo surgen cuando los diseños experimentales son deficientes.

Palabras clave

Estudios de asociación, pediatría, enfermedad compleja, polimorfismo genético, SNP, ADN mitocondrial

Abstract

Title: The genomics serving Pediatrics in the investigation of the multifactorial disease

In the last few years we have experienced an important growth of genomics and its different applications in biomedicine. In part, this has been possible due to the sudden development of the new genotyping technology and ultra-sequencing. The study of the genetic basis of the complex disease has been the main beneficiary of such technological development. There are a good number of pediatric diseases that can be approached following the same strategies employed in the genomic study of the multi-factorial disease. This revision tries to bring closer the possibilities which are offered by the genomics now and days to the pediatric field. Therefore the different study models as well as the problems that many times arise are discussed when the experimental designs are deficient.

Keywords

Association studies, Pediatrics, complex disease, genetic polymorphism, SNP, mitochondrial DNA

Fecha de recepción: 15/02/09. Fecha de aceptación: 24/03/09.

Correspondencia:

«... But the link between historical genetic demography and medically important risk is complex. Disease susceptibility may be genetic but not geographically clustered, or geographically clustered but not genetic, or neither, or both.»

Mary-Claire King, Arno G. Motulsky (*Science*. 2002)

En las últimas décadas, la genética y los estudios de asociación han contribuido significativamente al avance del conocimiento de la fisiopatología de múltiples enfermedades y, de forma particular, también dentro del campo de la pediatría. Esto ha supuesto una revolución en las estrategias de investigación, un desafío en el desarrollo de nuevas terapias, pero también exige una adaptación y una actualización por parte del pediatra que quiere conocer los pros y los contras de estas nuevas metodologías e integrarlas en su trabajo cotidiano o de investigación. En este artículo se revisan y discuten las bases conceptuales necesarias para la utilización y la interpretación de estas nuevas herramientas aplicadas a la pediatría.

El término de «enfermedad compleja» se aplica a las patologías de causa multifactorial, es decir, aquellas en cuyo origen interaccionan factores ambientales y factores genéticos. Algunos ejemplos de este tipo de enfermedades complejas, muchas de ellas de gran importancia en la infancia, son: diabetes mellitus, algunos tipos de cáncer, enfermedades infecciosas (enfermedad neumocócica, enfermedad meningocócica), enfermedad de Crohn, enfermedad celiaca, obesidad, trastorno por déficit de atención e hiperactividad, etc. El conocimiento de los genes implicados en el desarrollo de estas enfermedades nos permite predecir el riesgo, la susceptibilidad, el pronóstico o la resistencia a desarrollarlas.

¿Cuándo se sabe que una enfermedad multifactorial tiene un fondo genético? Una enfermedad compleja tiene un fondo genético cuando existe una agregación familiar, es decir, cuando ocurre con mayor incidencia dentro del ámbito familiar que lo que cabría esperar por azar entre individuos no relacionados en la población general.

Tras la secuenciación del genoma humano, el estudio y la comparación entre las pequeñas variaciones genéticas existentes entre individuos, conocidas como SNP (*single nucleotide polymorphisms* [polimorfismo de nucleótido simple]), ha supuesto un gran avance en el conocimiento de las causas genéticas de algunas enfermedades. El número de SNP identificados se ha visto enormemente incrementado en estos últimos años gracias al esfuerzo internacional en proyectos de genotipificación masiva, como el HapMap (<http://www.hapmap.org/>).

El ser portador de una o varias de estas variantes podría crear cierta susceptibilidad genética a presentar una enfermedad, ya sea porque dicha variante altera algún proceso funcional relacionado con la regulación genética del gen (su expresión) o simplemente porque altera el funcionamiento de la proteína o proteínas que son codificadas por los genes involucrados. Por ejemplo, una variante genética podría provocar algún cambio conformacional en la proteína y afectar a su función.

En ocasiones, los SNP que estamos analizando (SNP marcadores) no son los verdaderos causantes de la enfermedad, sino que éstos se encuentran cercanos en el genoma a los verdaderos SNP que directamente causan, o predisponen a presentar, la enfermedad (SNP causales). Cuando los SNP causales se coheredan con los SNP marcadores, se dice que estos SNP están en desequilibrio de ligamiento (*linkage disequilibrium* [LD]).

Por tanto, en ocasiones, el SNP marcador nos puede proporcionar información sobre un SNP causal cercano, aunque este último no sea genotipificado directamente. Las variantes genéticas que se coheredan (se transmiten como un «bloque» a la descendencia) se denominan «haplotipos».

Los estudios de asociación

Los estudios de asociación genética intentan responder a la pregunta siguiente: ¿qué papel desempeña el componente genético de los individuos en el desarrollo, la forma de presentación y el pronóstico de las enfermedades?

Los estudios de asociación de casos y controles son conceptualmente sencillos: las variantes genéticas de riesgo tenderán a presentarse con mayor frecuencia en una muestra de casos (individuos afectados) que en una muestra de controles (individuos sanos). Lo contrario ocurriría para una variante genética protectora. Existen varios pasos que se deben seguir a la hora de diseñar un estudio de asociación de casos y controles (figura 1):

- Recogida de un número suficiente de casos y controles que permita detectar la presunta asociación de la variante genética que estamos analizando con la enfermedad.
- Selección de las variantes genéticas (SNP) que van a ser analizadas.
- Genotipificación de los SNP.
- Análisis estadístico de los resultados con el fin de valorar si las variantes genéticas estudiadas están o no relacionadas con la enfermedad o algún aspecto de su evolución.

Recogida de muestras

Aunque conceptualmente sencillos, los estudios de asociación basados en poblaciones no están exentos de dificultades, algunas de las cuales se comentan brevemente a continuación.

Si los casos y los controles no están bien recogidos y el número de ellos no es el adecuado, tendremos que enfrentarnos a serios problemas de interpretación. Por ejemplo, los casos y controles deben pertenecer al mismo grupo poblacional ya que, de no ser así, es posible que determinadas variantes genéticas aparezcan como factores de riesgo cuando en realidad no tienen que ver con la enfermedad (falsos positivos), sino con las características propias de la población. Por otro lado, la probabilidad de determinar con éxito una relación causal entre una variante genética y una enfermedad depende en gran medida

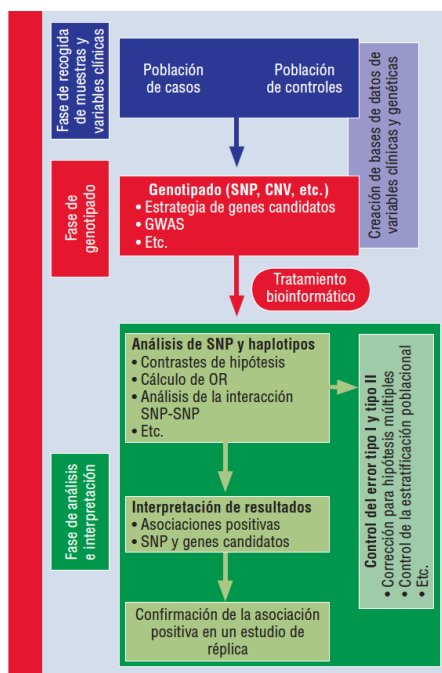


Figura 1. Un estudio de asociación comienza con la recolección de las muestras de individuos afectados (casos) e individuos sanos (controles) (fase 1). Posteriormente, las muestras se genotifican para distintos marcadores genéticos; el investigador debe decidir la estrategia que cabe seguir, que en parte vendrá determinada por el modelo de patología y el presupuesto para la genotipificación. Por ejemplo, se puede llevar a cabo un diseño basado en genes candidatos o, si el presupuesto es lo suficientemente grande, el investigador puede decantarse por una estrategia de búsqueda (cribado) genómica de marcadores genéticos (SNP, CNV, etc.) a lo largo de todo el genoma (fase 2). Todo ello requiere la creación de bases de datos perfectamente diseñadas y un desarrollo informático adecuado para el manejo de todos estos datos que, en ocasiones, podría implicar cientos de millones de genotipos. Una vez se han obtenido los resultados, interesa saber si las diferencias que se detectan en el grupo de casos con respecto al grupo control son estadísticamente significativas (usando por ejemplo un test de contraste de hipótesis), o conocer el riesgo que implica ser portador de una determinada variante (fase 3). Los estudios de interacción entre variantes genéticas (SNP-SNP) o de éstas con variables ambientales o clínicas, plantea grandes retos en cuanto al análisis estadístico, debido a la enorme dimensión que genera todo el universo posible de comparaciones (análisis) apareadas (combinaciones), lo que técnicamente se conoce como curse of dimensionality. El resultado final de los análisis genómicos en un estudio de asociación debe replicarse en un estudio independiente usando otra muestra de casos. En muchas ocasiones, la asociación positiva detectada se debe a la presencia de algún artefacto relacionado con el diseño o el análisis estadístico (error tipo I), o simplemente a que la potencia de nuestro estudio no es lo suficientemente grande (p. ej., tamaño muestral pequeño) como para detectar la asociación (error tipo II); así, para reducir al mínimo la posibilidad de que surjan estos problemas, existen determinadas variables que se deberían controlar en un estudio de asociación, como las correcciones adecuadas para hipótesis múltiple o el control de estratificación poblacional, etc.

del tamaño muestral: si la presunta asociación genética es débil, para poder identificarla necesitaremos tamaños muestrales más grandes (del orden de varios cientos o miles de casos y controles).

No sólo es el tamaño muestral lo que determina la capacidad de nuestro estudio para detectar la asociación; de hecho, hay otros muchos parámetros que deberían tenerse en cuenta, como la frecuencia de la variante genética en el grupo poblacional. Por ejemplo, un estudio será más sensible (tendrá más «potencia» para detectar la asociación) cuanto más frecuente sea la variante genética de interés.

La selección de las variables clínicas de la enfermedad que se deben recoger en un estudio de casos y controles es importante, ya que se podría encontrar una asociación entre una variante genética y un aspecto concreto del comportamiento y la evolución de la enfermedad (p. ej., en el caso de la enfermedad meningocócica, una variante genética podría explicar el riesgo de ser infectado por un serogrupo concreto u otro).

Selección de SNP y genotipificación

Existen varias maneras de abordar el estudio genético de una enfermedad. En el caso más sencillo, el investigador, usando sus casos y controles, puede desear replicar una asociación previamente descrita en la bibliografía de un SNP concreto. Esto sucede a menudo en los estudios de asociación, ya que existen muchos factores (algunos de ellos mencionados previamente) que generan falsos positivos de asociación.

El investigador podría plantearse la hipótesis de que algún grupo de genes pueda estar relacionado con una determinada patología (genes candidatos). Para estudiar la presunta asociación de estos genes con la enfermedad, se deberán seleccionar las variantes genéticas (SNP) dentro de estos genes para posteriormente ser genotipificadas en su muestra de casos y controles (e.j. ¹). Además de HapMap, existen otras muchas fuentes de información (bases de datos públicas accesibles por cualquier investigador en Internet), así como herramientas bioinformáticas para seleccionar los SNP de interés.

En el estudio genético de la enfermedad compleja, existe otra alternativa cada vez más demandada en la comunidad científica. Se trata del «barrido genómico», técnica hoy en día más conocida como *genome-wide association studies* (GWAS). En este tipo de estudio no existe una hipótesis preconcebida (como es el caso del «gen candidato»), sino que se trata de estudiar muchos miles de SNP distribuidos a lo largo de todo el genoma en busca de algún gen que pudiera estar asociado a la patología. Actualmente, hay un gran número de compañías que comercializan este tipo de análisis de genotipificación, lo cual facilita la labor del investigador. La gran desventaja de estos estudios es su alto coste; además, el análisis de los datos de un GWAS presenta importantes retos desde el punto de vista estadístico y de interpretación de resultados.

Por otro lado, un proyecto de asociación mínimamente ambicioso requiere un gran esfuerzo de genotipificación. Por ejemplo, genotipificar tan sólo 100 SNP en 400 casos y 400 controles supone realizar en total 80.000 genotipos. Afortunadamente, hoy en día existen métodos y «plataformas» de genotipificación que permiten obtener miles de genotipos en pocos días a un precio razonable, lo que hace cada vez más accesible este proceso a un mayor número de investigadores y laboratorios. Dependiendo del número total de genotipos y muestras para la genotipificación, se puede determinar cuál es la plataforma más adecuada.

Tratamiento estadístico e interpretación de los resultados en los estudios de asociación

Un hecho contrastado es que, a pesar de los muchos esfuerzos de genotipificación, son muy pocas las variantes polimórficas de riesgo que se han podido replicar en estudios independientes. Son muchos los motivos por los que un estudio de asociación no se replica¹. A continuación, se describen los aspectos más conflictivos a la hora de interpretar un estudio de asociación.

Estratificación poblacional

La estratificación poblacional es probablemente el mayor problema al que se enfrentan los estudios de asociación. Se ha mencionado anteriormente la necesidad de que los casos y los controles sean recogidos en el mismo grupo poblacional. La estratificación poblacional se refiere a la existencia de grupos poblacionales con distintas características genéticas que represente a la muestra de casos y de controles. Cuando se lleva a cabo el análisis estadístico de los datos, a menudo estas diferencias poblacionales entre casos y controles aparecen como asociadas a la enfermedad, sin tener ninguna relación con la patología, dando lugar a falsos positivos de asociación. Por ejemplo, imaginemos un caso extremo en que el grupo de casos se recoge en la población A (p. ej., población europea), y el grupo de controles se recoge en la población B (p. ej., población asiática). Debido a que estas dos poblaciones han tenido

distinta historia demográfica, algunos de los SNP analizados en nuestro estudio podrían tener distintas frecuencias en las poblaciones A y B. Cuando se hace el estudio de asociación entre casos y controles, dichas variantes aparecen estadísticamente asociadas con la enfermedad, cuando en realidad estos SNP no están relacionados con ella. Esto es, la variante genética aparece sobrerrepresentada en los casos con respecto a los controles, porque esta variante es más frecuente en la población A que en la población B, y no porque esté asociada con la enfermedad.

Una de las mejores maneras de prevenir la estratificación poblacional es recoger los casos y los controles sobre una población genéticamente «homogénea». Sin embargo, es muy difícil determinar hasta qué punto una población es lo suficientemente homogénea como para evitar el efecto negativo de la estratificación poblacional. De hecho, puede haber estratificación dentro de, por ejemplo, la población española, incluso dentro de regiones en el mismo país. Por dicho motivo se han desarrollado diversos métodos para detectar y hacer un seguimiento de este problema²⁻⁴.

Errores de genotipificación

Las técnicas de genotipificación y los procesos de manejo de datos no están exentos de posibles errores⁵. Supongamos un caso relativamente habitual, en que se establezca el genotipo de los pacientes en un laboratorio y los controles en otro. En un caso extremo, podría suceder que en un laboratorio se genotipifique erróneamente un SNP, dando lugar a una variante genética sobrerrepresentada en uno de los dos grupos (casos o controles), lo que automáticamente generaría una asociación estadística espuria. El efecto de los errores de genotipificación es bastante común en los estudios de asociación^{6,7}.

Correcciones estadísticas para hipótesis múltiples

Cuando se desea saber si un SNP está o no asociado a una enfermedad, es común llevar a cabo un contraste de hipótesis basado, por ejemplo, en una prueba de ji al cuadrado. Cuando se obtienen un valor de significación (p) por debajo de un umbral preestablecido (generalmente, $\alpha=0,05$), se asume que hay evidencias de que ese SNP está asociado a la enfermedad. El problema es que, cuando se estudian varios SNPs, la probabilidad de que alguno de ellos aparezca como «estadísticamente» asociado al azar se incrementa; como promedio, uno de cada 20 SNP estudiados aparecerá como estadísticamente asociado solamente por azar con un valor $\alpha=0,05$.

La realidad es que los valores de significación detectados en los estudios de asociación no siempre se corrigen para el número de contrastes de hipótesis realizados (p. ej., número de SNP genotipificados y/o número de variables clinicopatológicas analizadas, etc.). A menudo un investigador analiza varios cientos de SNP, pero el valor de significación que mantiene en su estudio sigue siendo de 0,05, cuando en realidad dicho umbral debería ajustarse en función del número total de hipótesis planteadas. Esto hace que el investigador determine erróneamente

que todos los SNP con valores por debajo de este umbral preestablecido de 0,05 estén asociados a la enfermedad.

Existen varios métodos para ajustar los umbrales de significación y corregir el efecto de las hipótesis múltiples. Uno de los métodos más utilizados en biomedicina es la corrección de Bonferroni, si bien hoy en día existen otros muchos métodos que podrían ser más apropiados en función de la naturaleza de los datos (p. ej., test de permutación, *bootstrapping*, etc.).

En resumen, entre los criterios razonables para declarar como verdadera la existencia de una asociación entre una variante genética y una enfermedad, habría que incluir los siguientes: a) debe haber garantías de que los resultados de asociación son genuinos y no están afectados por la estratificación poblacional; b) los valores de significación deben estar correctamente ajustados por test múltiple, y c) la asociación observada debe replicarse de manera consistente en otra muestra recogida de manera independiente (que represente al mismo grupo poblacional).

Estudios de asociación en pediatría

Existe un interés creciente en el campo de la pediatría por los estudios de asociación de enfermedades multifactoriales. Dicho interés viene incentivado, en gran medida, por las facilidades cada vez mayores de genotipificación en los hospitales y centros de investigación, el conocimiento cada vez más exhaustivo del genoma humano y sus variantes genéticas, y la accesibilidad libre a las principales bases de datos genéticas. Actualmente ya se han publicado varios estudios de asociación genética en enfermedades importantes, dada su elevada prevalencia en la población infantil (otitis media, asma, diabetes mellitus tipo 1, celiaquía, etc.), y otras de especial interés por su alta mortalidad y/o morbilidad en este grupo de edad (enfermedad meningocócica, enfermedad neumocócica). La genética también puede contribuir a elucidar las causas que podrían estar involucradas en otras entidades de gran relevancia, como el síndrome de muerte súbita⁸. Finalmente, se sospecha que existen factores genéticos involucrados en otros aspectos de gran interés en pediatría, como la posibilidad de predecir problemas relacionados con los trasplantes de órganos en niños o de pronosticar su evolución a medio y largo plazo⁸.

Binder, et al.⁹ han estudiado la presunta asociación de variantes genéticas localizadas en la región promotora (encargada de regular la función de uno o varios genes) del gen de la proteína C con la sepsis meningocócica. Entre otros hallazgos, estos autores defienden la presunta asociación de una variante genética con un mayor riesgo de infección meningocócica; los individuos afectados tienen además un riesgo incrementado de desarrollar sepsis. También en relación con la infección meningocócica, Bunker-Wiersma, et al.¹⁰ defienden que los portadores de una variante genética localizada en el receptor beta-1-adrenérgico tendrían un menor riesgo de mortalidad al ingreso. Nuestro grupo de investigación ESIGEM trabaja preci-

samente en estudios de asociación genética en la enfermedad meningocócica pediátrica. Recientemente se ha identificado una asociación estadística entre el riesgo de padecer dicha enfermedad y una variante localizada en el genoma mitocondrial; sin embargo, dicha asociación podría deberse a la presencia de una sobrerrepresentación de población inmigrante en la población de casos con respecto a la población de controles (datos aún no publicados). Esto indicaría que el factor genético de riesgo podría estar localizado en otras partes del genoma, y no necesariamente en el genoma mitocondrial. La sobrerrepresentación de población inmigrante en la muestra de casos indicaría que este grupo poblacional presenta un factor genético de riesgo (pero no necesariamente mitocondrial) en relación con la población local que lo hace más susceptible a padecer la enfermedad. El grupo ESIGEM sigue trabajando intensamente en esta línea de investigación, así como en proyectos de genotipificación a gran escala (GWAS).

En estos últimos años, la enfermedad de Kawasaki ha sido objeto de estudio en varios ensayos genéticos. Cheung, et al.¹¹ han propuesto que determinados SNP localizados en el gen de la proteína C reactiva (*CRP*) y el gen del factor de necrosis tumoral (*TNF*) estarían relacionados con una mayor predisposición genética a presentar la enfermedad. Algunos estudios previos^{12,13} ya habían sugerido la existencia de otros factores genéticos involucrados en la modulación de la susceptibilidad a padecer la enfermedad, así como en su pronóstico, su progresión y sus posibles complicaciones.

También recientemente, Velázquez-Cruz, et al.¹⁴ han propuesto que varios polimorfismos localizados en el gen 1 de la muerte celular programada (*PDCD1*) podrían estar involucrados en la presentación precoz del lupus eritematoso sistémico, cuyo pronóstico es peor en la población pediátrica que en los adultos.

Entre las enfermedades altamente prevalentes, el asma es una de las que ha suscitado un interés especial de los investigadores. En un reciente editorial, Nieto-García¹⁵ hace una revisión sobre el estado actual de la investigación genética en el asma, así como de las dificultades que existen para entender el comportamiento de la enfermedad como resultado de su naturaleza multifactorial (poligénica y ambiental).

Es importante reseñar que la mayoría de los estudios de asociación genética necesitan ser validados en muestras de casos y controles independientes y en distintos grupos poblacionales. Sin embargo, algunos de estos estudios no han podido ser replicados, lo cual se podría explicar por muy diversos factores. Entre los más importantes habría que destacar todos los relacionados con un diseño inadecuado del estudio de asociación (tamaños muestrales pequeños de casos y controles, estratificación poblacional, etc.), o por una interpretación estadística deficiente que deriva frecuentemente en un incremento de falsos positivos de asociación.

Por primera vez en la historia de la genética se nos presenta la gran oportunidad de descubrir los agentes responsables de

la enfermedad compleja. Como pediatras, es esencial actualizar nuestra base de conocimiento genético y aunar nuestro esfuerzo con el de todos los profesionales implicados en las ciencias de la salud, ya que sólo de esta manera se puede integrar esta herramienta de forma útil en la práctica clínica diaria, y se posibilita el diseño de los estudios de asociación con las garantías necesarias para esclarecer definitivamente la etiología multifactorial de la enfermedad pediátrica.

Agradecimientos

Este proyecto y la línea de investigación del grupo de investigación ESIGEM han sido financiados por: Xunta de Galicia (PGIDIT06PXIB208079PR), Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña, Instituto Carlos III y Consellería de Sanidade-Xunta de Galicia RH107/2 (Intensificación de la actividad investigadora F. Martínón-Torres), Instituto Carlos III (Intensificación de la actividad investigadora Ana Vega Gliemmo), Convenio de colaboración de investigación Wyeth España-Fundación IDICHUS, y el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS; PI070069).

Bibliografía

- Hilgendorff A, Heidinger K, Bohnert A, Kleinsteinber A, König IR, Ziegler A, et al. Association of polymorphisms in the human surfactant protein-D (SFTPD) gene and postnatal pulmonary adaptation in the preterm infant. *Acta Paediatr.* 2009; 98: 112-117.
- Devlin B, Roeder K. Genomic control for association studies. *Biometrics.* 1999; 55: 997-1.004.
- Pritchard JK, Rosenberg NA. Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. *Am J Hum Genet.* 1999; 65: 220-228.
- Pritchard JK, Donnelly P. Case-control studies of association in structured or admixed populations. *Theor Popul Biol.* 2001; 60: 227-237.
- Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nat Rev Genet.* 2005; 6: 847-859.
- Abecasis GR, Cherny SS, Cardon LR. The impact of genotyping error on family-based analysis of quantitative traits. *Eur J Hum Genet.* 2001; 9: 130-134.
- Gordon D, Finch SJ, Nothnagel M, Ott J. Power and sample size calculations for case-control genetic association tests when errors are present: application to single nucleotide polymorphisms. *Hum Hered.* 2002; 54: 22-33.
- Arnestad M, Opdal SH, Vege A, Rognum TO. A mitochondrial DNA polymorphism associated with cardiac arrhythmia investigated in sudden infant death syndrome. *Acta Paediatr.* 2007; 96: 206-210.
- Binder A, Endler G, Rieger S, Geishofer G, Resch B, Mannhalter C, et al. Protein C promoter polymorphisms associate with sepsis in children with systemic meningococemia. *Hum Genet.* 2007; 122: 183-190.
- Bunker-Wiersma HE, Koopmans RP, Kuipers TW, Knoester H, Bos AP. Single nucleotide polymorphisms in genes of circulatory homeostasis in surviving pediatric intensive care patients with meningococcal infection. *Pediatr Crit Care Med.* 2008; 9: 517-523.
- Cheung YF, Huang GY, Chen SB, Liu XQ, Xi L, Liang XC, et al. Inflammatory gene polymorphisms and susceptibility to kawasaki disease and its arterial sequelae. *Pediatrics.* 2008; 122: e608-e614.
- Biezeveld MH, Kuipers IM, Geissler J, Lam J, Ottenkamp JJ, Hack CE, et al. Association of mannose-binding lectin genotype with cardiovascular abnormalities in Kawasaki disease. *Lancet.* 2003; 361: 1.268-1.270.
- Quasney MW, Bronstein DE, Cantor RM, Zhang Q, Stroupe C, Shike H, et al. Increased frequency of alleles associated with elevated tumor necrosis factor-alpha levels in children with Kawasaki disease. *Pediatr Res.* 2001; 49: 686-690.
- Velázquez-Cruz R, Orozco L, Espinosa-Rosales F, Carreno-Manjarrez R, Solís-Vallejo E, López-Lara ND, et al. Association of PDCD1 polymorphisms with childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Eur J Hum Genet.* 2007; 15: 336-341.
- Nieto-García A. Fenotipos, genotipos y tratamiento del asma. *An Pediatr.* 2008; 69: 293-299.

